N° d'ordre : 2301

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR de 3e CYCLE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie

par

JEAN-MARIE ZAJAC

LE CERVELET DES LAGOMORPHES EST-IL UN BON MODELE POUR L'ETUDE DES MECANISMES ENCEPHALINERGIQUES ?

Soutenue le 27 novembre 1979 devant la Commission d'Examen :

MM	ZALTA J.P.	Président
	COUTEAUX R.	Examinateurs
	CROS J.	
	MEUNIER J.C.	

N° d'ordre : 2301

THÈSE

présentée

À L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR de 3e CYCLE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie

par

JEAN-MARIE ZAJAC

LE CERVELET DES LAGOMORPHES EST-IL UN BON MODELE POUR L'ETUDE DES MECANISMES ENCEPHALINERGIQUES ?

Soutenue le 27 novembre 1979 devant la Commission d'Examen :

MM.	ZALTA J.P.	Président
	COSTEROUSSE O. CROS J. MEUNIER J.C.	Examinateurs

N° d'ordre : 2301

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ PAUL SABATIER DE TOULOUSE (SCIENCES)

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR de 3e CYCLE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie

par

JEAN-MARIE ZAJAC

LE CERVELET DES LAGOMORPHES EST-IL UN BON MODELE POUR L'ETUDE DES MECANISMES ENCEPHALINERGIQUES ?

Soutenue le 27 novembre 1979 devant la Commission d'Examen :

MM	ZALTA J.P.	Président
	COUTEAUX R.	Examinateurs
	CROS J.	
	MEUNIER J.C.	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE PAUL SABATIER

PRESIDENCE

M. MARTIN ..... Président
M. LARENG ..... 1er Vice-Président
Mlle GOUYON ..... 2ème Vice-Président

ORDRE DES SCIENCES

HONORARIAT

M. BEDOS ..... Professeur honoraire
M. BLAIZOT ..... Doyen honoraire
M. CAPDECOMME .. Doyen honoraire, Recteur honoraire, Correspondant de l'Institut, Professeur honoraire
M. COUCHET ..... Professeur honoraire
M. DUPOUY ..... Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile .. Doyen honoraire, Professeur honoraire
M. GAUSSEN ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. MARGULIS ..... Professeur honoraire
M. MASDUPUY ..... Professeur honoraire
M. MATHIS ..... Doyen honoraire
M. MIGNONAC ..... Professeur honoraire
M. MIQUEL ..... Professeur honoraire
M. MORQUER ..... Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT ..... Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER . Professeur honoraire
M. VANDEL ..... Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. DUPIN ..... Professeur honoraire
M. TRICHE ..... Professeur honoraire
M. PERRIER ..... Professeur honoraire
M. GALLAIS ..... Professeur honoraire
M. LESBRE ..... Professeur honoraire
M. SERFATY ..... Professeur honoraire

CORPS ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. FERT ..... Physique
M. HURON ..... Mathématiques Appliquées
M. LEDOUX ..... Zoologie Appliquée
M. RIVALS ..... Agriculture
M. MATHIS ..... Chimie
M. ORLIAC ..... Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE .. Physique
M. ANGELIER ..... Zoologie
Mlle de FERRE ..... Botanique
M. FARRAN ..... Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET ..... Physique Théorique et Calcul Numérique
M. LAGASSE ..... Electrotechnique
M. BLANC ..... Physique Nucléaire
M. LEREDDE ..... Botanique
M. LELUBRE ..... Géologie
M. LALAGUE ..... Mathématiques Générales
M. BOUIGUE ..... Astronomie
M. ASSELINEAU .... Chimie Biologique
M. MAURET ..... Chimie Systématique
M. AGID ..... Physiologie
M. MONTANT ..... Cryptogamie
M. GAUTIER ..... Physique
M. CRUMEYROLLE . Mathématiques
M. GOURINARD .... Géologie
M. PULOU ..... Minéralogie
M. CAMBOU ..... Physique Spatiale
M. LACOSTE ..... Electrotechnique
M. THIBAULT ..... Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART ..... Mathématiques
M. MEDIONI ..... Psychophysiologie
M. RAYNAUD P. .... Physiologie Animale
M. ZALTA ..... Chimie Biologique
M. SEVELY ..... Electrotechnique
M. POMMIEZ ..... Mathématiques
M. REY Paul ..... Biologie Végétale
M. COULOMB ..... Physique
M. TRINQUIER ..... Physique
M. MARONI ..... Chimie
M. BEETSCHEN .... Biologie Générale
M. DERACHE ..... Physiologie Animale
M. SATGE ..... Chimie Organique
M. LATTES ..... Chimie
M. VEDRENNE ..... Géophysique
M. DURAND-DELGA Géologie
M. CARRARA ..... Physique
M. MAHENC ..... Chimie
M. MIROUSE ..... Géologie
M. BITSCH ..... Zoologie
M. DEGEILH ..... Physique
M. MARTIN J.C. .... Génie Electrique
M. REY Gérard ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SICARD ..... Biologie Génétique
M. SOUQUET ..... Géologie
M. TOUZE ..... Physiologie Végétale
M. FRASNAY ..... Mathématiques (Algèbre et Combinatoire)
M. CASSAGNAU .... Zoologie
M. CAUSSINUS ..... Mathématiques Appliquées (Statistiques Appliquées)
M. PESCIA ..... Physique
M. PICCA ..... Physique de l'Atmosphère
M. BAUDIERE ..... Botanique Fondamentale et Pyrénéenne
M. BARRANS ..... Chimie Physique Organique
M. POILBLANC ..... Chimie Minérale
M. PERENNOU ..... Informatique
M. ATTEIA ..... Mathématiques
M. CASTAN ..... Informatique
M. COLLETTE ..... Physique
M. REME ..... Mesures Physiques

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. MERIC ..... Mathématiques Appliquées
Mme LECAL ..... Zoologie
M. PILOD ..... Physique
M. LARROQUE ..... Physique
Mlle LAPEYRE ..... Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND ..... Chimie
M. DESQ ..... Mathématiques
M. ROCARD ..... Electronique
M. GUERIN ..... Mathématiques
M. SCHNEIDER ..... Biologie Cellulaire
M. de LOTH ..... Chimie Physique
M. SAPORTE ..... Physique
M. THENOZ ..... Génie Civil
M. DURAND Ph. ..... Physique
M. FONTAN ..... Physique Nucléaire
M. BAUDRAS ..... Chimie Biologique
M. CALVET ..... Mécanique des Fluides
M. PAGANI ..... Physique
M. BEAUFILS ..... Informatique
M. BERTHELEMY ... Zoologie
M. TERJANIAN ..... Mathématiques
M. MORUCCI ..... Génie Biologique et Médical
M. BONEL ..... Chimie
M. SOTIROPOULOS . Chimie Organique
M. CUPPENS ..... Mathématiques
M. VERDIER ..... Physique
M. ETTINGER ..... Mathématiques
M. BONNET Louis ... Biologie
M. JOSSERAND .... Mesures Physiques
M. ROUTIE ..... Génie Chimique
M. COTTU ..... Génie Mécanique
M. HURAUX ..... Physique
Mme GERVAIS ..... Chimie Inorganique
M. BANCEL ..... Mathématiques
M. LOUARN ..... Génétique
M. BOUDET ..... Physiologie Végétale
M. LETAC ..... Mathématiques

PROFESSEURS ASSOCIES

M. GUMOWSKI ..... Mathématiques
M. SHELDON ..... Physique

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle BARBANCE .... Mathématiques
M. GILLY ..... Génie Mécanique
M. MARAL ..... Physique
M. LEGRAND ..... Génie Civil
M. ABATUT ..... Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. MAUSS ..... Mécanique
M. BETOURNE ..... Informatique
M. CAMPAN ..... Psychophysiologie
M. CLERC ..... Mécanique
M. GRIFONE ..... Mathématiques
M. COUOT ..... Mathématiques, Analyse Numérique
M. NGUYEN THANH VAN Mathématiques
M. TRAVERSE ..... Problèmes Chimiques de l'Energie
M. ALRAN ..... Génie Chimique
M. REY J. ..... Géologie Sédimentaire et Paléontologie
M. DARTIGUENAVE Chimie Minérale Moléculaire
M. HERAULT ..... Chimie
M. PRADINES ..... Mathématiques
M. GALINIER ..... Informatique
M. VIGNOLLE ..... Informatique
M. DEPARIS ..... Embryologie
M. CAVALIE ..... Physiologie Végétale
M. MASSOL ..... Chimie des Composés Organiques et Organominéraux d'intérêt biologique
M. HARTMANN .... Mécanique
M. ROUSSET ..... Chimie Appliquée (Matériaux)
M. TARDY ..... Sciences de la Terre et Aménagement
M. HOLLANDE ..... Biologie Cellulaire
M. DUGAS ..... Physique des Energies Nouvelles

CHERCHEURS DU C.N.R.S.

DIRECTEURS DE RECHERCHE

M. GIRALT Georges
M. LABARRE Jean
M. LAURENT Jean-Pierre
M. LEGRIS
M. MARTINOT Henri
M. MAZEROLLES
M. NYSTERAKIS F.
M. PRADAL
M. WOLF Robert

MAITRES DE RECHERCHE

M. AGUILAR MARTIN José
Mme ASSELINEAU Cécile
M. AZEMA Pierre
M. BUXO Jean
Mme DARTIGUENAVE M.
M. ESTEVE Daniel
M. GALY Jean
M. HAWKES Peter
M. HOUALLA Doureid
M. JEREBZOFF
M. MALRIEU J.P.
Mme MARONI Yvette
Mme MATHIS
M. MUNOZ Aurélio
M. NAVECH
M. PRAJOUX Roland
M. SEVELY Jean
M. VACQUIE Serge

⁂

CORPS DES OBSERVATOIRES ASTRONOMIQUES ET INSTITUTS DE PHYSIQUE DU GLOBE

Mme ANDRILLAT Y. Astronome titulaire
M. BOUIGUE Roger .. Astronome titulaire
M. COUPINOT G. ... Astronome adjoint
M. LEROY J. Louis .. Physicien adjoint
M. MIANES ..... Astronome adjoint
M. PEDOUSSAUT A. .. Astronome adjoint
M. ROBLEY Robert .. Physicien titulaire
M. ROSCH Jean ..... Astronome titulaire
M. SAISSAC Joseph .. Physicien titulaire

⁂

ADMINISTRATION

M. PRINEAU ..... Secrétaire Général de l'Université

Liste établie au 1er Octobre 1978
pour l'année universitaire 1978 - 1979

Je remercie Monsieur le Professeur C. PAOLETTI, Directeur du Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales (C.N.R.S.), de m'avoir accepté au sein de son Laboratoire et de m'avoir ainsi permis de travailler dans une de ses équipes.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur J.P. ZALTA d'accepter de présider cette commission d'examen.

Je remercie également Monsieur le Professeur J. CROS et Monsieur le Professeur R. COUTEAUX d'avoir bien voulu être membres du jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur J.C. MEUNIER pour avoir assuré ma formation en neurobiologie en me faisant profiter de son expérience et de ses conseils.

Il m'est agréable d'exprimer ma reconnaissance à l'ensemble du personnel du Laboratoire pour sa gentillesse et sa disponibilité et en particulier à Madame C. MOISAND, Messieurs A. MOISAND et A. PUGET pour l'aide technique qu'ils m'ont apportée.

Je remercie enfin, Mesdames J. BOSC, M.H. FAYE, J. PRUNET et D. RICARDOU pour le soin qu'elles ont apporté à la réalisation pratique de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION..... 2

II - MATERIEL ET METHODES..... 7

II.1. ANIMAUX..... 7
II.2. MICROINJECTION STEREOTAXIQUE..... 7
II.3. DISSECTIONS..... 7
II.4. HOMOGENATS..... 10
II.5. DOSAGE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES..... 10
II.6. LOCALISATION DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES PAR AUTORADIOGRAPHIE..... 11
II.6.1. LIAISON DE [^{3}H]ETORPHINE ET DE LA [^{3}H]DIPRENORPHINE SUR COUPES DE CERVELET DE LAPIN..... 11
II.6.2. AUTORADIOGRAPHIE..... 11
II.7. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE D'HOMOGENATS DE "CERVEAU" ET DE CERVELET..... 12
II.7.1. PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES..... 12
II.7.2. MARQUAGE PAR LA [^{3}H]ETORPHINE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES..... 13

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS..... 16

III.1. DEMONSTRATION, CARACTERISATION ET DISTRIBUTION REGIONALE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVELET DES LAGOMORPHES..... 16
III.1.1. INTRODUCTION..... 16
III.1.2. DEMONSTRATION..... 16
III.1.3. CARACTERISATION..... 16
III.1.4. DISTRIBUTION REGIONALE..... 19
III.1.5. DISCUSSION..... 22

III.2. ONTOGENESE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVEAU DU LAPIN 24
III.2.1. INTRODUCTION 24
III.2.2. PROFILS DE DEVELOPPEMENT DES SITES RECEPTEURS AU COURS DE L'ONTOGENESE 24
III.2.3. DISCUSSION 26
III.3. AUTORADIOGRAPHIE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVELET DU LAPIN 27
III.3.1. INTRODUCTION 27
III.3.2. MARQUAGE DES COUPES DE CERVELET AVEC LA [^{3}H]DIPRENORPHINE 28
III.3.3. AUTORADIOGRAPHIE 28
III.3.4. DISCUSSION 32
III.4. DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DU "CERVEAU" ET DU CERVELET DE LAPIN 35
III.4.1. INTRODUCTION 35
III.4.2. DISTRIBUTION DANS LES FRACTIONS NUCLEAIRE (P1) MITOCHONDRIALE (P2) ET MICROSOMALE (P3) 35
III.4.3. ESSAIS DE LOCALISATION "FINE" 37
III.4.4. DISCUSSION 37
III.5. EFFETS DES LESIONS PAR L'ACIDE KAINIQUE SUR LES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVELET DE LAPIN 42
III.5.1. INTRODUCTION 42
III.5.2. OBSERVATIONS CLINIQUES 42
III.5.3. ANALYSE HISTOLOGIQUE 42
III.5.4. DOSAGE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES 44
III.5.5. DISCUSSION 44

IV - CONCLUSION GENERALE 48

V - BIBLIOGRAPHIE 51

I - INTRODUCTION

Les opiacés sont des analgésiques centraux dont certaines propriétés suggèrent qu'ils interagissent avec des sites de reconnaissance qui leurs sont spécifiques : les sites récepteurs des opiacés. En effet :

1°) les opiacés agissent à très faible dose (quelques microgrammes par kilogramme pour l'étorphine)

2°) leur action est stéréospécifique : les isomères de la série (-) sont beaucoup plus actifs que les isomères de la série (+)

3°) de légères modifications de leur structure moléculaire peuvent se traduire par un changement radical de leur activité. Ainsi, suffit il de substituer au groupement N-méthyl de la morphine le groupement N-allyl pour obtenir la nalorphine, un antimorphinique (ou antagoniste).

C'est en 1973 que Pert et Snyder, Simon et al et Terenius utilisant des puissants narcotiques à haute radioactivité spécifique ont identifié, dans le cerveau des rongeurs, des sites de liaison dont les propriétés sont les suivantes :

1°) en nombre fini, ils lient les opiacés de façon réversible et stéréospécifique (Goldstein et al, 1971)

2°) leur affinité intrinsèque pour un grand nombre d'opiacés, agonistes et antagonistes, *in vitro* est en étroite corrélation avec leur affinité apparente dans divers tests pharmacologiques *in vivo* (Creese et Snyder, 1975 ; Kosterlitz et Waterfield, 1975 ; Wilson et al, 1975)

3°) leur distribution dans le système nerveux central des vertébrés est discrète et coïncide notamment avec les voies nociceptives paleospinothalamiques. Ils sont aussi présents en quantité importante dans l'amygdale, le striatum, l'hypothalamus et le système limbique (Kuhar et al, 1973 ; Pert et Snyder, 1975 ; Pert et al, 1975 ; Atweh et Kuhar, 1977, a, b, c).

Les sites récepteurs des opiacés sont présents dans le système nerveux central de tous les vertébrés et leurs propriétés sont presque identiques du vertébré le plus primitif à l'homme. La plupart des espèces n'ont aucun contact avec les morphiniques naturels contenus dans les végétaux. L'hypothèse la plus raisonnable, pour expliquer cette présence constante au cours de l'évolution, est de postuler un rôle physiologique à ces sites récepteurs et donc l'existence d'un ligand endogène spécifique à ceux-ci.

Une telle substance, possédant des effets morphinomimétiques sur les contractions du vas deferens de la souris et de l'iléon de cobaye a été découverte par Hughes (1975), dans des extraits de cerveau de porc. Le principe actif de ces extraits a été purifié (Hughes et al, 1975) ; il se compose de deux pentapeptides appelés méthionine-encéphaline et leucine-encéphaline. La séquence d'amino-acides de la méthionine-encéphaline est identique à celle des résidus 61-65 de la βlipotropine (βLPH) isolée par Li de la glande pituitaire de chameau (Li, 1964). Ce fait remarquable a été à l'origine de la recherche et de l'isolement d'autres peptides, aux propriétés similaires, à partir d'extraits d'hypothalamus et de glande pituitaire. Du fait de la prolifération du nombre de peptides, Simon a suggéré le terme générique d'endorphine pour désigner ces composés endogènes à propriété morphinomimétique.

Le groupe de Guillemin (Guillemin et al, 1976 ; Ling et al, 1976) a isolé deux peptides appelés α-endorphine et γ-endorphine, qui sont en fait, respectivement la βLPH (61-76) et la βLPH (61-77). Cox et al (1976) et Bradbury (1976) ont montré que le fragment C terminal de la βLPH (61-91), rebaptisé β-endorphine par Li, est le plus actif des peptides endogènes opioides.

Toutes les endorphines, y compris les encéphalines, possèdent les propriétés de liaison caractéristiques des agonistes opiacés (Simantov et Snyder, 1976 ; Audigier et al, 1977 ; Meunier et Moisand, 1977 ; Lord et al, 1977) ; elles provoquent en outre, injectées dans différentes régions du cerveau tous les effets des morphiniques ; analgésie, hypothermie, catatonie, dépression respiratoire, etc (Belluzi et al, 1976 ; Chang et al, 1976).

Le dosage radioimmunologique des endorphines a permis d'étudier leur localisation (Simantov et al, 1977,a ; Yang et al, 1977), celle-ci a été confirmée et précisée par les techniques d'histoimmunofluorescence (Elde et al, 1976 ; Simantov et al, 1977, b ; Watson et al, 1977, a, b). De manière générale, les encéphalines sont localisées dans les régions riches en sites récepteurs des opiacés. Il existe, cependant, des régions riches en encéphalines et en βendorphine bien séparées (Rossier et al, 1977 ; Bloom et al, 1978). Les corps cellulaires contenant les encéphalines et leurs prolongements nerveux sont distribués à travers tout le cerveau et la moelle épinière (Hökfelt et al, 1977, a, b ; Simantov et al, 1977, b ; Watson

et al, 1977). Les concentrations les plus élevées d'encéphalines sont observées dans le globus pallidus, le striatum, l'hypothalamus et la corne dorsale de la moelle épinière. Si les études par radioimmunologie, dans diverses régions du cerveau, montrent des variations importantes dans le rapport méthionine/leucine encéphaline, les études histoimmunochimiques ne décèlent aucune différence dans la répartition de ces deux peptides.

Plusieurs types de données suggèrent que les encéphalines jouent le rôle de neurotransmetteur dans le cerveau.

a) les encéphalines sont présentes dans les terminaisons nerveuses (Simantov et al, 1976 ; Elde et al, 1976)

b) elles sont libérées sous l'action d'agents dépolarisants (Henderson et al, 1978 ; Iversen et al, 1978)

c) elles sont rapidement inactivées dans le cerveau (Simantov et Snyder, 1976 ; Marks et al, 1977) ; cette dégradation pourrait, en outre, mettre en jeu une peptidase spécifique située au voisinage des sites récepteurs (Malfroy et al, 1978)

d) les encéphalines sont synthétisées dans le cerveau (Hughes et al, 1978 ; Lewis et al, 1978)

e) enfin, elles sont présentes dans certaines voies neurales (Uhl et al, 1978 ; Hökfelt et al, 1977, a, b ; Cuello et Paxinos, 1978).

En résumé, les encéphalines et les autres peptides opioides semblent bien s'identifier aux ligands naturels des sites récepteurs des opiacés. Reste à déterminer leur mécanisme d'action, c'est-à-dire, la série d'évènements qui accompagnent leur interaction avec les sites récepteurs des opiacés.

Un problème non encore résolu est la localisation de ces derniers.

Des expériences de lésions des afférences sensorielles (Lamotte et al, 1976 ; Atweh et al, 1978) et de la voie nigro-striatale (Pollard et al, 1977) suggèrent une localisation présynaptique des sites récepteurs. Cette hypothèse paraît être confirmée par d'autres types d'expériences *in vitro* : les opioides inhibent la libération, induite par le potassium, de substance P dans le noyau trigeminal (Jessell et Iversen, 1977) et de la noradrénaline du cortex cérébral chez le rat (Taube et al, 1976 ; Arbilla et Langer, 1978). L'approche électrophysiologique apporte à ce sujet des données contradictoires. Appliquées par microiontophorèse, les encéphalines inhibent l'activité électrique, spontanée et glutamate induite, des neurones de différentes régions (Zieglsgansberger et Bayerl, 1976 ; Gent et Wolstencroft, 1976), suggérant une localisation postsynaptique des sites récepteurs des opiacés.

Barker et al (1978) ont montré, en revanche, que les endorphines inhibent les réponses du glutamate d'une manière non compétitive et que cet effet est distinct de celui d'un neurotransmetteur classique. Mudge et al (1979), étudiant l'inhibition de la libération de substance P dans les cultures de neurones sensoriels, tirent la même conclusion, que les encéphalines agissent plutôt comme des neuromodulateurs.

L'analyse du mécanisme d'action des endorphines se trouve confrontée au difficile problème du choix du matériel d'étude. Les cultures d'hybride neuroblastome gliome, du fait de l'homogénéité de leurs populations, ont permis l'approche des bases moléculaires des phénomènes de tolérance et de dépendance (Sharma et al, 1975 ; Klee et Nirenberg, 1974 ; Hamprecht, 1977). Les cultures organotypiques de moelle épinière et de ganglion dorsal de souris foetale ont également été utilisées avec succès (Crain et al, 1977 ; Hiller et al, 1978). Ce type de système isolé reste cependant assez éloigné d'une situation biologique intégrée.

Comme nous l'avons vu, l'action neuromodulatrice des encéphalines n'a pu être proposée que grâce à l'utilisation de systèmes relativement bien connus et de structure simple, comme la moelle épinière, la glande pituitaire et le striatum. Ces régions sont cependant complexes par leurs relations avec les structures nerveuses environnantes.

En revanche, le cervelet des mammifères, outre qu'il est parfaitement bien délimité dans l'espace, volumineux et facile d'accès, est une région du cerveau dont la cytoarchitecture et la physiologie sont déjà abondamment documentées (Palay et Chan Palay, 1974 ; Eccles et al, 1967).

Nous pensons donc, par rapport à ce qui a été dit, qu'il se présente comme un excellent modèle pour l'analyse du mécanisme d'action des opiacés. Les résultats que nous allons exposer ci-après démontrent le bien fondé de cette thèse.

II - MATERIEL ET METHODES

II.1. ANIMAUX

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des souris "Swiss", des rats "Wistar", des hamsters dorés, des ochotones afghans, des lapins dérivés de néo-zélandais et des lièvres communs.

En outre, un grand nombre de portées synchrones (voir chapitre III. Ontogénèse) ont été obtenues après insémination artificielle de la lapine, par une méthode mise au point par le Dr. A.PUGET.

II.2. MICROINJECTION STEREOTAXIQUE

Les lapins (environ 1,5 kg) sont anesthésiés avec du pentobarbital (Nembutal ^{R}, i.v.). La peau du crâne est incisée au scalpel et la tête de l'animal est immobilisée dans un cadre de stéréotaxie (La Précision Cinématographique, Paris) Avec une fraise de dentiste, le crâne est trépané, sur la suture médiane, au niveau de la protubérance occipitale interne. L'aiguille, très fine (30 1/2 G) est descendue de - 8mm (par rapport à la surface du crâne) dans le vermis Les solutions d'acide α-méthyl aspartique (αMAA) et d'acide kainique (KA) à la concentration de 4 µg/µl dans du NaCl à 0,9 % (pH neutre) sont injectées par un pousse seringue (B.Braun Melsungen) équipé d'une seringue Hamilton de 100 µl. Le débit est de 0,8 µl/min et le volume injecté ne dépasse jamais 5 µl

II.3. DISSECTIONS

Les animaux sont décapités, leur cerveau rapidement extirpé et débarrassé des méninges. Nous avons effectué les dissections suivantes :

- *cerveau* : medulla oblongata, pons, mesencephale, diencéphale et télencéphale. La table I démontre la reproductibilité de cette dissection.
- *cervelet* : vermis et hémisphère. Le vermis a été subdivisé en lingula, lobulus centralis, culmen, lobus medius medianus, pyramis, uvula et nodulus ; l'hémisphère en lobulus ansiformis, lobus paramedianus, flocculus et paraflocculus.

La dissection des couches moléculaires et granulaires s'effectue après durcissement du cervelet à - 20°C. Des coupes sagittales de 1 millimètre d'épaisseur sont placées dans du Tris HCl 50 mM pH 7,4 NaCl 100 mM et découpées à l'aide de très fines pinces sous la loupe binoculaire (photo 1).

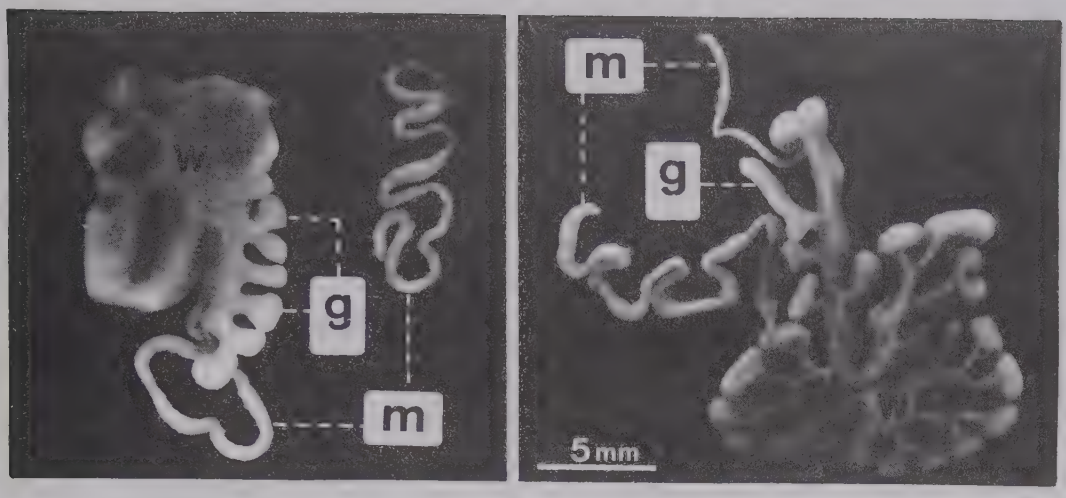


photo. 1 : Dissection de la couche moléculaire (m). A gauche un hémisphère, à droite le vermis. Les couches du cortex cerebelleux sont facilement reconnaissables : couche moléculaire (m), couche granulaire (g), substance blanche (w).

TABLE 1.

Poids du tissu frais (mg)

	Souris (6)	Hamster (3)	Rat (3)	Ochotone afghan (3)	Lapin (4)	Lièvre (3)
moelle épinière		93 ± 3	158 ± 3	163 ± 9	588 ± 10	781 ± 72
pons		32 ± 5	52 ± 3	65 ± 6	251 ± 18	351 ± 45
mesencephale	371 ± 19	77 ± 9	122 ± 6	157 ± 12	615 ± 16	917 ± 49
diencephale		94 ± 2	184 ± 22	193 ± 13	770 ± 21	1,196 ± 75
telencephale		587 ± 15	1,022 ± 42	1,265 ± 35	5,037 ± 166	8,035 ± 314
cervelet	64 ± 5	153 ± 4	268 ± 30	372 ± 16	1,458 ± 131	1,897 ± 168

Dissections des différentes régions anatomiques du cerveau de trois rongeurs (souris, hamster et rat) et de trois lagomorphes (ochotone afghan, lapin et lièvre). Le poids des animaux est, en grammes : souris : 37 ± 2 ; hamster : 146 ± 6 ; rat : 269 ± 12 ; ochotone afghan : 218 ± 13 ; lapin : 2 400 ± 200 et lièvres : 2 700 ± 300. Les valeurs représentent les moyennes ± déviation standard, de mesures indépendantes dont le nombre est indiqué entre parenthèses. Le "cerveau" de souris, du fait de sa petite taille, a été pesé entier.

II.4. HOMOGENATS

Le tissu frais est pesé puis homogénéisé dans du tampon froid (Tris HCl 50 mM, pH 7,4 ou Krebs Ringer : NaCl 118,5 mM ; KCl 4,7 mM ; KH_2PO_4 : 1,2 mM ; $MgSO_4 7H_2O$: 1,2 mM ; $Na_2HPO_4 2H_2$: 16,1 mM, pH : 7,4), à raison de 100 x n mg de tissu dans un volume final de 1,2 n ml de tampon. L homogénéisation est achevée avec un Potter Elvehjem par 20 allées et venues du piston à 50 % de la vitesse maximale du moteur (800 - 1 000 rpm). L'homogénat ainsi obtenu contient environ 10 milligrammes de protéine par ml, dosée par la méthode de Lowry et al (1951) avec la sérum albumine bovine comme standard.

II.5. DOSAGE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES

II.5.1. Les sites de liaison des opiaces sont dosés en milieu tampon (Tris 50 mM ou Krebs Ringer) par la méthode de Pert et Snyder (1973). Les tubes de dosage, en triple, contiennent 1 à 2 mg de protéines, la concentration voulue de [^{3}H]étorphine ou de [^{3}H]naloxone dans un volume final de 1 ml. La liaison non spécifique des opiacés marqués est mesurée en présence de 1 µM de levorphanol.

Après 20 minutes (naloxone) ou 30 minutes (étorphine) d'incubation à 35°C, les tubes sont plongés dans la glace et leur contenu rapidement filtré sur disque de fibre de verre Whatman GF/B. La radioactivité libre ou faiblement liée est lavée par 2 x 5 ml de tampon froid.

Les filtres sont séchés et la radioactivité retenue est comptée avec 10 ml de mélange scintillant : toluène 0,7 l, Triton N 101 : 0,3 l, butyl PBD 7 g. Par définition la radioactivité liée au filtre et sensible au levorphanol est considérée comme spécifique.

II.5.2. La liaison de la [^{3}H]naloxone a également été mesurée par ultracentrifugation dans des conditions similaires. Après incubation pendant 20 minutes à 35°C, les tubes de dosage contenant un volume d'essai de 2 ml, sont plongés dans la glace et centrifugés à 4°C pendant 30 minutes à 30 000 rpm (rotor 40, Beckman). Le surnageant est éliminé ; la surface du culot est rincée avec 2 ml de tampon Tris HCl 50 mM froid. Le culot est ensuite resuspendu par 0,3 ml de SDS 1 % (W : V), et transféré quantitativement dans des fioles à scintillation où la radioactivité est mesurée comme précédemment.

II.6. LOCALISATION DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES PAR AUTORADIOGRAPHIE

II.6.1. LIAISON DE [^{3}H]ETORPHINE ET DE LA [^{3}H]DIPRENORPHINE SUR COUPES DE CERVELET DE LAPIN

Les lapins sont décapités et le cervelet rapidement excisé. Le vermis isolé par dissection est congelé dans l'azote liquide et débité en coupes sagittales de 20 microns d'épaisseurs à -15 °C dans un cryostat Ames (Miles). Ces coupes sont recueillies sur lames gélatinées et stockées à - 15°C (les lames gélatinées sont préparées par immersion dans une solution de gélatine 0,5 %, alun de chrome 0,5 % dans H_2O).

Ramenées à 4°C, puis à température ambiante, les coupes sont incubées avec 0,2 ml de solution Krebs Ringer 1 nM ou 0,3 nM de [^{3}H]étorphine (35.4 Ci/mmole) ou de [^{3}H]diprenorphine (17 Ci/mmole) en présence et en l'absence de levorphanol 10^{-6} M à la température ambiante pendant des temps variables. Les coupes sont ensuite lavées pendant des temps variables par immersion dans un grand volume de tampon Krebs Ringer à 4°C ; puis séchées et détachées de leur support avec 0,025 ml de SDS 1 % (W : V). La radioactivité contenue dans ce volume est mesurée avec 10 ml de mélange scintillant.

II.6.2. AUTORADIOGRAPHIE

On procède de manière identique sur des coupes sagittales et coronales de 5 µM d'épaisseur de cervelet de lapin, incubées pendant 15 minutes à température ambiante en 1 nM [^{3}H]étorphine ou [^{3}H]diprenorphine avec ou sans levorphanol 10^{-6} M et avec ou sans dextrorphan 10^{-6}M. Les coupes sont ensuite lavées pendant 15 minutes à 4°C en milieu Krebs Ringer puis séchées rapidement à 4°C et deshydratées complètement à -20°C en présence d'actigel.

La couche d'émulsion photographique est appliquée sur ces lames, ramenées à température ambiante, par immersion dans une solution de NTB_3 Kodak diluée 1 : 4 dans l'eau distillée. Les autoradiogrammes sont ensuite séchés et stockés à -20°C en présence d'actigel.

Certaines coupes sont fixées, après marquage et lavage, par immersion dans une solution de Krebs Ringer contenant 1,5 % (W : V) de glutaraldéhyde pendant 3 heures à 4°C. Ces coupes sont ensuite lavées pendant une heure dans le même tampon froid et séchées comme précédemment.

Avant d'appliquer l'émulsion photographique, toutes les coupes fixées et certaines non fixées sont plongées quelques secondes dans une solution de nitrocellulose 1 % dans l'acétate d'amyle, à température ambiante et séchées.

Après 5 à 8 semaines d'exposition, les grains d'argent sont relevés par du D19b Kodak (2 minutes à 18°C), fixés (fixateur Guilleminot) et les coupes colorées au bleu de toluidine. Dans ces conditions, on n'observe pas de chemographie ni positive ni négative. Il faut noter toutefois que l'utilisation d'un film protecteur de nitrocellulose est indispensable sur les coupes fixées au glutaraldehyde pour prévenir une chemographie positive importante.

Nous avons également employé une méthode différente, récemment décrite par Young et Kuhar (1979), destinée à limiter la diffusion du ligand radioactif lors du contact avec l'émulsion photographique.

Une lamelle de verre est enduite d'émulsion (NTB3 Kodak, 1 : 1 dans l'eau distillée) par immersion, séchée et apposée sur les coupes marquées également séchées. Après 4 à 5 semaines d'exposition à 4°C, la lamelle et la coupe sont doucement séparées l'une de l'autre ; le marquage est révélé comme précédemment et la coupe colorée. L'ensemble est réapposé avec précision et examiné sous le microscope.

II.7. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE D'HOMOGENATS DE "CERVEAU" ET DE CERVELET

II.7.1. PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

Nous avons utilisé, avec quelques modifications, la méthode décrite par Gurd et al (1974). Toutes les opérations sont effectuées à 4°C, les solutions contiennent sauf précision supplémentaire 1 mM Tris, 0,1 mM EDTA et le pH est ajusté à 7,4.

Les lapins sont décapités, le cerveau rapidement excisé est divisé en cervelet et "cerveau". Le tissu est homogénéisé dans du sucrose 0,32 M (1g de tissu frais dans 10 ml) comme précédemment décrit (*II.4*). L'homogénat dilué 1 : 4 avec du sucrose 0,32 M est centrifugé à 1 000 g pendant 7,5 minutes. Le culot (P1, fraction nucléaire brute) est repris dans 5 ml de sucrose 0,32 M. Le surnageant (S1) est centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes. Le culot (P2, fraction mitochondriale brute) est lavé 3 fois avec un volume de sucrose 0,32 M égal à celui de S1. La fraction P3 (fraction microsomale) est obtenue par cen-

trifugation des surnageants combinés de lavage du P2 pendant 120 minutes à 140 000 g. Les culots P2 et P3 sont repris chacun dans 5 ml de sucrose 0,32 M. Les sites de liaison des opiacés sont dosés comme précédemment décrit (*II.5.1*) avec la [^{3}H]étorphine 1 nM en Tris 50 mM pH 7,4 (0,1 ml d'homogénat pour 1 ml final).

II.7.2. MARQUAGE PAR LA [^{3}H]ETORPHINE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

L'homogénat d'un cervelet ou d'un cerveau est divisé en deux parties égales et incubé pendant 30 minutes à 35°C en présence de 2 nM [^{3}H]étorphine, en présence et en l'absence de levorphanol 10^{-6} M. Les tubes sont ensuite plongés dans la glace et les homogénats sont dilués 1 : 4 avec du sucrose 0,32 M froid.

Les fractions particulaires P1, P2, P3 sont obtenues par centrifugation différentielle dans les conditions précisées ci-dessus.

La fraction mitochondriale brute (ou synaptosomale brute) est sous fractionnée en gradient discontinu de Ficoll.

La fraction P2 reprise dans 5 ml de sucrose 0,32 M est déposée sur trois couches de Ficoll 7,5, 13 et 17 % (dans du sucrose 0,32 M, Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) de 10 ml chacune et centrifugée à 25 000 rpm pendant 120 minutes (Rotor SW.27, Beckman). Le gradient est collecté par le fond en fraction de 20 gouttes. La radioactivité est mesurée dans 0,50 ml de chacune des fractions avec 10 ml de liquide scintillant.

Le matériel collecté à l'interface 13, 7,5 % Ficoll est utilisé pour la préparation de membranes plasmiques synaptiques. Ce matériel est dilué dans 3 volumes de sucrose 0,32 M, centrifugé pendant 30 minutes à 97 000g (60TI ; 40 000 rpm). Le culot repris dans le même volume de sucrose est centrifugé pendant 20 minutes à 10 000 g. Le culot obtenu est alors resuspendu dans un faible volume de sucrose 0,32 M et dilué dans 10 volumes de tampon : Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,4 froid. La suspension est aspirée 5 fois à travers une aiguille jauge n° 14 et incubée 90 minutes à 4°C. Les conditions de lyse des synaptosomes en milieu alcalin sont celles préconisées par Cotman et Matthew (1971). La suspension est ensuite réaspirée 5 fois à travers l'aiguille et centrifugée à 78 000 g pendant 30 minutes. Le culot est resuspendu dans 2,5 ml de sucrose 0,32 M et la suspension déposée sur un gradient discontinu de sucrose composé de 4 couches de 3 ml chacune de 1,3 M ; 1,0 M ; 0,8 M ; 0,6 M , centrifugé pendant 90 minutes à 51 000 g (SW 27.1, Beckman)

Le gradient est collecté par le fond en fraction de 10 gouttes et la radioactivité mesurée comme précédemment.

La fraction microsomale (P3) est sous fractionnée sur un gradient discontinu de sucrose. Le P3, lavé une fois, est repris dans 5 ml de sucrose 0,32 M, la suspension est déposée sur 4 couches de 8 ml chacune de 1,3 ; 1,0 ; 0,8 ; 0,6 M sucrose (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4) et centrifugée 16 heures à 25 000 rpm (SW 27, Beckman). Le gradient est collecté par le fond en fractions de 20 gouttes et la radioactivité contenue dans chacune d'elle est mesurée sur 0,5 ml.

Dans chacun des cas, le matériel collecté aux interfaces des diverses couches du gradient est dilué dans 10 volumes de sucrose 0,32 M, centrifugé à 100 000g pendant 30 minutes. Ce culot resuspendu dans un faible volume de sucrose 0,32 M est utilisé à la détermination de la quantité de protéines présente aux interfaces.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. DEMONSTRATION, CARACTERISATION ET DISTRIBUTION REGIONALE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVELET DES LAGOMORPHES

III.1.1. INTRODUCTION

Nous avons insisté (voir introduction générale), sur le fait que l'analyse des mécanismes encéphalinergiques pourrait être simplifiée si l'on disposait d'un système neuronal dont 1) la cytoarchitecture et 2) la physiologie sont déjà bien documentées et qui 3) soit riche en sites de liaison des opiacés. Nous démontrons dans ce chapitre que le cervelet de lapin, qui satisfait bien entendu aux deux premières conditions, est également une structure dont la densité en sites récepteurs des opiacés est très importante.

III.1.2. DEMONSTRATION

Les sites de liaison de la [^{3}H] étorphine (1nM) ont été dosés (*II.5.1*) dans les homogénats totaux de diverses régions du cerveau de trois rongeurs (souris, hamster, rat) et de trois lagomorphes (ochotone afghan, lapin et lièvre). La table 2 montre que dans le cerveau (moins le cervelet) la distribution régionale de ces sites varie peu d'un ordre à l'autre, sauf dans le méso-diencéphale qui en possède davantage chez les rongeurs. Dans le cervelet, en revanche, il existe d'énormes différences : celui des lagomorphes lie de 100 à 200 femtomoles de [^{3}H] étorphine par milligramme de protéine, c'est à dire 10 à 20 fois plus que le cervelet des rongeurs (10-15 fmoles/mg). La densité en sites du cervelet de lapin est comparable à celle du diencéphale, une région reconnue riche en sites récepteurs des opiacés chez les mammifères. En quantité totale, les sites cérébelleux représentent, chez les lagomorphes, 13 à 19 % de l'ensemble des sites du cerveau. Chez les rongeurs, ils ne représentent que 1 à 2 %. A titre de comparaison, un cervelet de lapin contient autant de sites de liaison de l'étorphine (26,6 ± 1,2 picomoles, n = 4) que l'ensemble du cerveau d'un rat adulte (28,7 ± 1,1 picomoles, n = 3).

III.1.3. CARACTERISATION

Afin de vérifier que les sites de liaison de la [^{3}H] étorphine du cervelet de lapin sont bien de véritables sites récepteurs des opiacés, nous avons comparé leur "profil pharmacologique" à celui des sites du "cerveau" (cerveau moins le cervelet).

Les courbes de liaison de la [^{3}H] étorphine, un agoniste, à des

TABLE 2. Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)

	Souris (6)	hamster (3)	rat (3)	Ochotone afghan (3)	lapin (4)	lièvre (3)
moelle épinière		111 ± 3	100 ± 6	97 ± 9	104 ± 9	105 ± 4
pons		160 ± 21	158 ± 20	132 ± 12	119 ± 12	108 ± 10
mesencephale	133 ± 21	222 ± 4	210 ± 18	148 ± 14	142 ± 11	147 ± 21
diencephale		226 ± 6	211 ± 15	176 ± 10	205 ± 27	175 ± 24
telencephale		133 ± 8	145 ± 7	146 ± 17	142 ± 10	165 ± 18
cervelet	13 ± 3	15 ± 3	9 ± 3	103 ± 15	174 ± 20	194 ± 38

Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (1nM) dans les différentes régions du système nerveux central de rongeurs (souris, hamster et rat) et de lagomorphes (ochotone afghan, lapin et lièvre) Les valeurs sont les moyennes, ± déviation standard, de dosages indépendants sur des animaux dont le nombre est indiqué entre parenthèses. Le "cerveau" de souris, du fait de sa faible taille, a été étudié comme une seule partie.

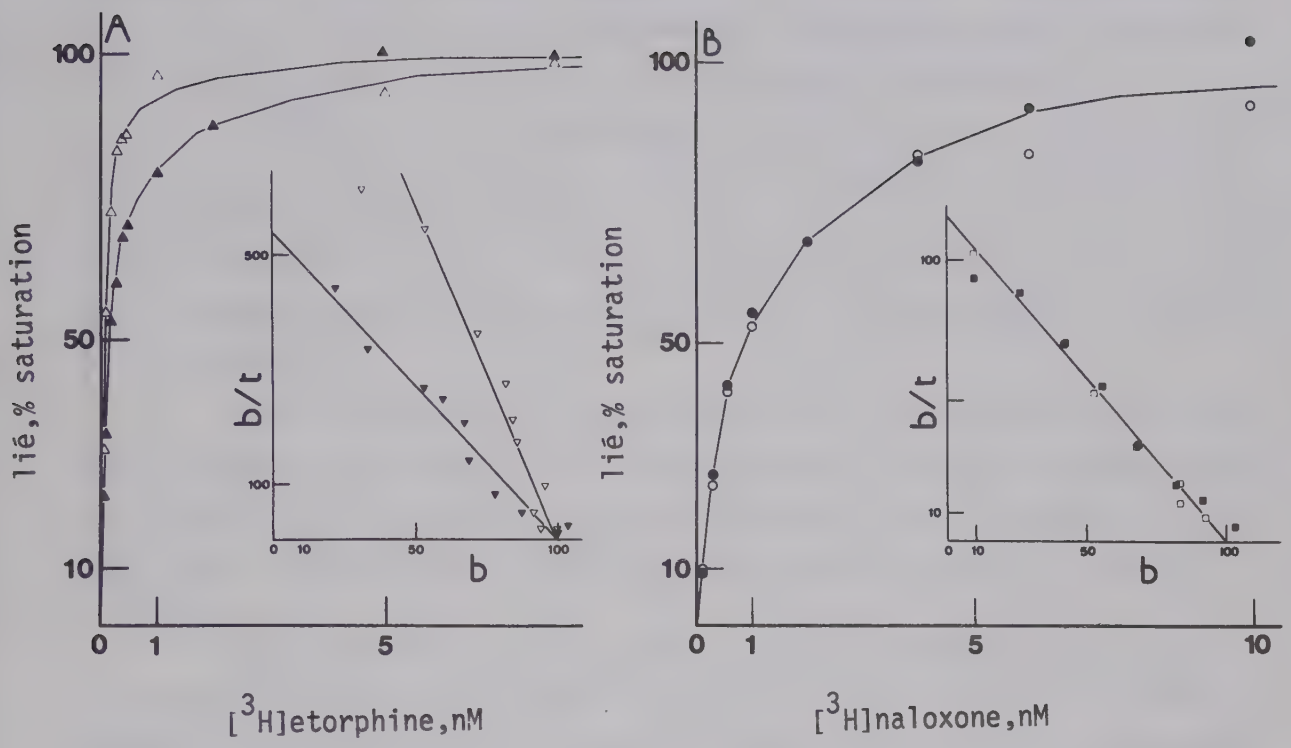


figure 1 et 2 : Courbes de saturation de la liaison spécifique de la [^{3}H]étorphine (fig.1) et de la [^{3}H]naloxone (fig.2) aux homogénats de "cerveau" (symboles noirs) et de cervelet (symboles blancs). Les représentations de Scatchard correspondantes sont insérées dans les figures. Les quantités de ligand liées (b) aux préparations à chaque concentration (t) sont exprimées en pourcentage de la valeur obtenue à saturation.

homogénats totaux de "cerveau" et de cervelet sont de type michaelien (fig. 1). Dans les deux cas, entre 0,1 et 8,0 nM de ligand tritié, la représentation de Scatchard est linéaire, ce qui suggère l'homogénéité des sites. Les constantes de dissociation pour l'étorphine dans le "cerveau" et le cervelet sont voisines : 0,2 nM et 0,1 nM respectivement.

La [^{3}H] naloxone, un antagoniste, se lie aux deux types d'homogénats avec la même affinité (K_D = 0,9 nM). Là encore, la représentation de Scatchard est compatible avec une seule classe de site, du moins entre 0,1 et 10,0 nM (fig. 2), car à des concentrations plus élevées, la liaison non spécifique devient prépondérante et rend l'interprétation des résultats plus difficile.

La liaison de la [^{3}H] naloxone (1 nM) aux homogénats n'est pas modifiée par le dextrorphan 1 µM, alors que sa valeur est réduite de moitié en présence de lévorphanol 1,7 nM (cervelet) et 2,6 nM ("cerveau"). De la même façon, les valeurs CI 50 pour la morphine sont presque identiques (table 3).

Nous avons également étudié un autre paramètre, décrit par plusieurs auteurs (Pert et Snyder, 1974 ; Simon et al, 1975) : "l'effet sodium". En présence d'ions sodium la liaison des antagonistes opiacés est augmentée, alors que celle des agonistes est diminuée. La table 3 montre que cet effet est observé dans les homogénats du cervelet de lapin. En présence de 100 mM NaCl il est nécessaire d'utiliser 15,2 (11,1) fois plus d'étorphine, 23,5 (17,3) fois plus de lévorphanol et 26,1 (25,0) fois plus de morphine pour déplacer 50 % de la liaison stéréospécifique de la [^{3}H] naloxone 1 nM à des homogénats de cervelet ("cerveau"). L'effet sodium est donc qualitativement et quantitativement le même pour les sites du cervelet et du "cerveau".

III.1.4. DISTRIBUTION REGIONALE

Nous avons analysé la distribution des sites de liaison de la [^{3}H] étorphine dans les homogénats des diverses régions anatomiques du cervelet de lapin.

La table 4 indique que toutes les régions étudiées contiennent de tels sites mais en concentration variable. Ainsi les hémisphères cérébelleux semblent-ils plus riches que le vermis et de manière générale, l'archécervelet plus pauvre que le néocervelet, bien que les différences observées soient minimes.

TABLE 3.

	CI_{50} (mole x l^{-1})		rapport $\frac{\text{+ 100 mM NaCl}}{\text{sans NaCl}}$
	sans NaCl	+ 100 mM NaCl	
naloxone	1.4 (1.4) x 10^{-9}	1.0 (1.3) x 10^{-9}	0.7 (0.9)
étorphine	2.3 (2.7) x 10^{-10}	3.5 (3.0) x 10^{-9}	15.2 (11.1)
levorphanol	1.7 (2.6) x 10^{-9}	4.0 (4.5) x 10^{-8}	23.5 (17.3)
morphine	1.3 (2.0) x 10^{-8}	3.4 (5.0) x 10^{-7}	26.1 (25.0)

Concentrations d'opiacés non marqués nécessaires pour inhiber de 50 % (CI_{50}) la liaison stéréospécifique de la [^{3}H]naloxone 1nM aux homogénats de cervelet et de "cerveau" (valeurs entre parenthèses) de lapin. Le rapport représente "l'index sodium". Les valeurs des CI_{50} ont été déterminées par analyse log-probit. Dosage par centrifugation.

TABLE 4.

région du cervelet	Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)
VERMIS	
lingula + lobulus centralis	104 ± 16
culmen (dosal + ventral)	134 ± 27
lobus medius medianus	158 ± 22
pyramis	142 ± 32
uvula	125 ± 12
nodulus	74 ± 16
HEMISPHERES	
lobulus ansiformis	172 ± 22
lobulus paramedianus	176 ± 29
paraflocculus	157 ± 37
flocculus + pedunculi cerebellaris	100 ± 12

Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (1nM) dans les différentes régions anatomiques du cervelet de lapin. Les valeurs sont les moyennes, ± déviation standard, de dosages indépendants sur cinq cervelets.

Il était intéressant d'étudier la distribution des sites récepteurs des opiacés entre les diverses couches histologiques du cervelet. La table 5 montre que la couche moléculaire lie environ 360 femtomoles de [^{3}H] étorphine par milligramme de protéine, soit deux fois plus que la couche granulaire (167) et dix fois plus que la substance blanche (31). Il faut noter que, ce que nous appelons "substance blanche" est probablement contaminé par une partie des noyaux gris profonds du cervelet.

III.1.5. DISCUSSION

La présente étude a démontré que contrairement à celui des rongeurs, le cervelet des lagomorphes est riche en sites de liaison de la [^{3}H] étorphine ; ainsi les homogénats de cervelet de lapin lient-ils 174 ± 20 femtomoles d'étorphine par milligramme de protéine contre 9 ± 3 chez le rat.

Ces sites ont des propriétés de liaison identiques à celles de véritables sites récepteurs des opiacés (Pert et Snyder, 1973 ; Simon et al, 1973 ; Terenius, 1973) : stéréospécificité, très haute affinité pour les opiacés, agonistes (0,1 nM pour l'étorphine) et antagonistes (0,9 nM pour la naloxone) et sensibilité différentielle aux ions sodium. Ils se distinguent donc des sites de liaison spécifique de la naloxone décrits par Lee et al (1977) et par Squires et Broestrup(1978) dans les homogénats de cervelet de rat.

Hughes et al (1977) ont analysé la distribution des encéphalines dans différents tissus de plusieurs espèces et ont rapporté, en particulier, la présence de quantités appréciables de méthionine encéphaline dans le cervelet de lapin, sans détecter de leucine-encéphaline. Nos observations sont donc parfaitement en accord avec les leurs.

Les sites récepteurs des opiacés ne sont pas distribués uniformément dans le cervelet. Leur dosage biochimique dans les homogénats des diverses couches histologiques, montre qu'ils sont essentiellement localisés dans le cortex, notamment dans la couche moléculaire et, à un degré moindre dans la couche granulaire. Ils sont pratiquement absents dans la substance blanche. Il est donc possible, bien qu'apparemment homogène au plan de leurs propriétés de liaison que les sites récepteurs des opiacés soient associés, dans le cervelet de lapin, à deux (au moins) types cellulaires distincts.

Ces résultats sont tout à fait originaux et particulièrement

TABLE 5.

Couche	Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)	Densité relative à la couche moléculaire
moléculaire	359 $\pm$ 58 (6)	1.00
granulaire	167 $\pm$ 12 (6)	0.47
substance blanche	31 $\pm$ 5 (6)	0.09

Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (1nM) dans les différentes couches histologiques du cervelet de lapin. Les valeurs sont les moyennes, $\pm$ déviation standard, de dosages indépendants. Le nombre d'animaux utilisé est indiqué entre parenthèses.

encourageants. En effet, la localisation précise des sites récepteurs des opiacés est une étape essentielle de l'analyse des mécanismes encéphalinergiques. Or, le cervelet des mammifères est une des régions du cerveau dont la cytoarchitecture (Palay et Chan-Palay, 1974) et la physiologie (Eccles et al, 1967) sont particulièrement bien connues, situation favorable donc à une étude de ce type.

La suite de ce travail est consacréeà la localisation cellulaire et subcellulaire des sites récepteurs des opiacés dans le cervelet de lapin. Nous verrons que parmi les diverses approches mises en oeuvre dans cette perspective, certaines (autoradiographie, lésions chimiques) se sont avérées beaucoup plus riches d'enseignements que d'autres (ontogénèse, fractionnement subcellulaire).

III.2. ONTOGENESE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVEAU DU LAPIN

III.2.1. INTRODUCTION

Nous avons étudié le développement des sites récepteurs opiacés au cours de l'ontogénèse du système nerveux central du lapin. Le but de cette analyse était double :

1) établir une corrélation entre le développement de ces sites et un événement morphogénétique connu qui permettait essentiellement de les localiser non seulement dans le temps, mais surtout dans l'espace.

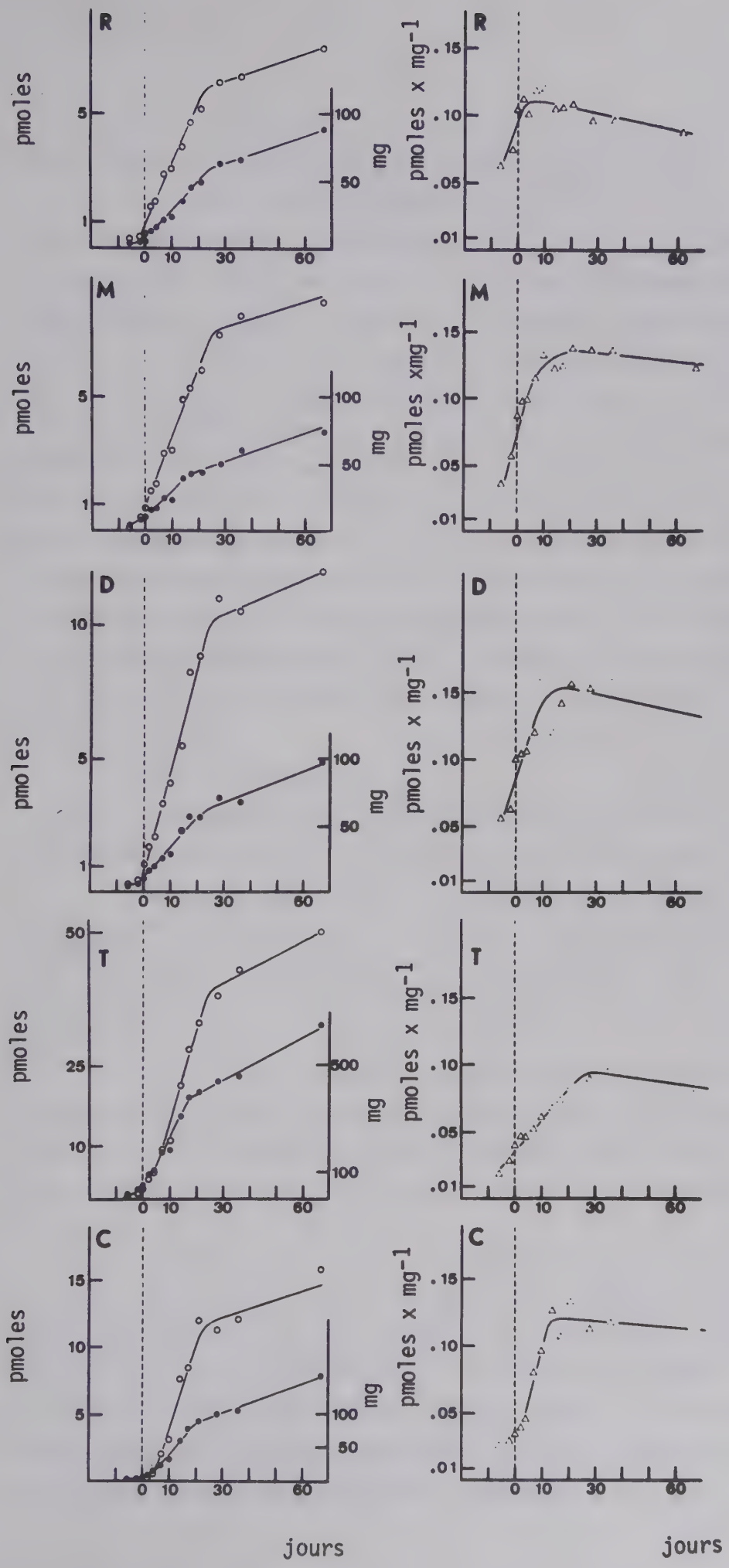
2) déterminer leur période de développement la plus rapide, c'est à dire, la "période critique" au cours de laquelle les cellules auxquelles ils sont associés sont particulièrement sensibles aux agressions expérimentales (voir discussion).

III.2.2. PROFILS DE DEVELOPPEMENT DES SITES RECEPTEURS AU COURS DE L'ONTOGENESE

Pour les cinq régions anatomiques étudiées : rhombencéphale (moins le cervelet), mesencéphale, diencéphale, télencéphale et cervelet, nous avons mesuré au cours de l'ontogénèse ; l'augmentation globale 1) du nombre de sites de liaison de la [^{3}H] naloxone 1 nM, 2) de la quantité de protéines ; et l'activité spécifique de liaison exprimée en femtomoles de naloxone liée par milligramme de protéine (figure 3).

Six jours avant la naissance on peut doser les sites de liaison de la naloxone dans toutes les régions, y compris le cervelet, bien que

figure 3 : Ontogénèse des sites de liaison de la [^{3}H]naloxone (1 nM) dans les différentes régions du cerveau de lapin : rhombencephale (R), mesencephale (M), diencéphale (D), télencéphale (T) et cervelet (C).
La quantité de sites de liaison est exprimée en picomoles (Pmoles) de [^{3}H]naloxone liée spécifiquement aux homogénats. La quantité de protéines est exprimée en milligramme (mg) et l'activité spécifique de liaison en picomoles par mg de protéine (Pmoles/mg). Chaque point représente la moyenne d'essais indépendants sur trois animaux. Le jour zéro (jour de naissance) est matérialisé par une ligne verticale en pointillée.


R
M
D
T
C
pmoles
mg
pmoles x mg-1
pmoles xmg-1
jours
jours

celui-ci soit à un stade de développement très précoce.

Le nombre de sites totaux reste faible jusqu'à la naissance, on note dans le cervelet 1 % des sites de liaison au jour zéro (jour 31 de gestation) par rapport au jour 67 ; 4 % pour le télencéphale ; 10 % pour le rhombencéphale. Après la naissance leur nombre augmente rapidement jusqu' au 25ème jour de façon similaire pour toutes les régions étudiées, puis leur vitesse d'apparition se stabilise parallèlement à celle des protéines totales. Le développement de la densité des sites de liaison de la naloxone, révèle par contre des variations régionales importantes ; la densité maximale, en particulier, est atteinte à des âges différents : à la naissance pour le rhombencéphale, entre les jours 15 et 20 pour le mésencéphale et le diencéphale et au jour 30 pour le télencéphale. Le cervelet montre une densité de sites de liaison relativement faible à la naissance (45 femtomoles par mg) et jusqu'au jour 4-5 ; il atteint une densité égale à celle de l'adulte (125 femtomoles par mg) au jour 15, c'est à dire en une très courte période de temps.

III.2.3. DISCUSSION

Nous avons étudié le développement des sites de liaison de la [^{3}H] naloxone au cours de l'ontogénèse du système nerveux central du lapin.

Le dosage des sites a été effectué en milieu physiologique, après préincubation des homogénats, de manière à favoriser la dégradation des substances morphinomimétiques peptidiques endogènes, dont la présence en concentration variable au cours du développement risque de modifier de façon aléatoire le nombre de sites accessibles.

Les résultats obtenus indiquent que le développement des sites récepteurs des opiacés dans le cerveau de lapin est essentiellement post-natal et qu'il présente un évident gradient caudo-rostral : le rhombencéphale montrant une densité maximale de sites à la naissance, le télencéphale au jour 30.

Les sites de liaison de la [^{3}H] naloxone du cervelet présentent un profil de croissance similaire aux autres régions du cerveau. Cependant, ils se caractérisent par une augmentation très rapide de leur densité entre le 5ème jour et le 15ème jour après la naissance, c'est à dire au moment où le cortex cérébelleux connaît une croissance axo-dendritique très importante. Cette simultanéité suggère que les sites récepteurs des opiacés pourraient être un composant neuritique important.

par la [^{3}H] diprénorphine, un antagoniste opiacé de très haute affinité (voir *II.6.1.*).

III.3.2. MARQUAGE DES COUPES DE CERVELET AVEC LA [^{3}H] DIPRENORPHINE

Nous avons étudié les différents paramètres de la liaison de la [^{3}H] diprénorphine à des coupes de cervelet de 20 µm d'épaisseur, de manière à déterminer les conditions optimales de marquage.

Les cinétiques de liaison de la [^{3}H] diprénorphine 1 nM et 0,3 nM sont montrées sur la figure 4. Le tissu est incubé pendant les temps indiqués et lavé 10 minutes (voir *II.6.1*). Aux deux concentrations étudiées, la liaison augmente avec le temps d'incubation, jusqu'à un plateau, atteint après 10 minutes en 1 nM (300 cpm/coupe), au bout de 30 minutes en 0,3 nM (170 cpm/coupe). La valeur de l'activité spécifique de liaison à la concentration de 1 nM de diprénorphine est comparable à celle obtenue avec des homogénats totaux de cervelet : de l'ordre de 140 femtomoles par milligramme de protéine.

Nous avons également analysé l'influence du lavage sur la liaison de la [^{3}H] diprénorphine. Des coupes de 20 µm d'épaisseur incubées en 1 nM [^{3}H] diprénorphine pendant 30 minutes en présence et en l'absence de lévorphanol 10^{-6} M sont lavées pendant des temps variables (fig. 5). On note une libération rapide, lors des 10 premières minutes de la radioactivité liée de façon non spécifique (courbe "+ lev"). La liaison stéréospécifique, représentée par la différence entre les deux courbes en revanche, est peu modifiée même après une heure de lavage.

Les conditions de marquage que nous avons choisi sont donc les suivantes : 15 minutes d'incubation avec 1 nM [^{3}H] diprénorphine à température ambiante, suivies par 15 minutes de lavage à 0-4°C. Dans ces conditions, 75 à 80 % de la radioactivité totale est liée spécifiquement, c'est à dire, une proportion satisfaisante pour l'autoradiographie.

III.3.3. AUTORADIOGRAPHIE

Des coupes de 5 microns d'épaisseur de toutes les régions du cervelet de lapin ont été marquées par la [^{3}H] diprénorphine 1 nM, comme décrit précédemment, soumises au processus autoradiographique (*II.6.2.*) et exposées pendant 5 à 8 semaines.

Le marquage révélé est stéréospécifique (table 6). La majorité des grains d'argent se répartit de manière inégale dans le cortex cérébelleux entre les couches moléculaire et granulaire. La densité du marquage au niveau de la substance blanche et des noyaux cérébelleux est très peu

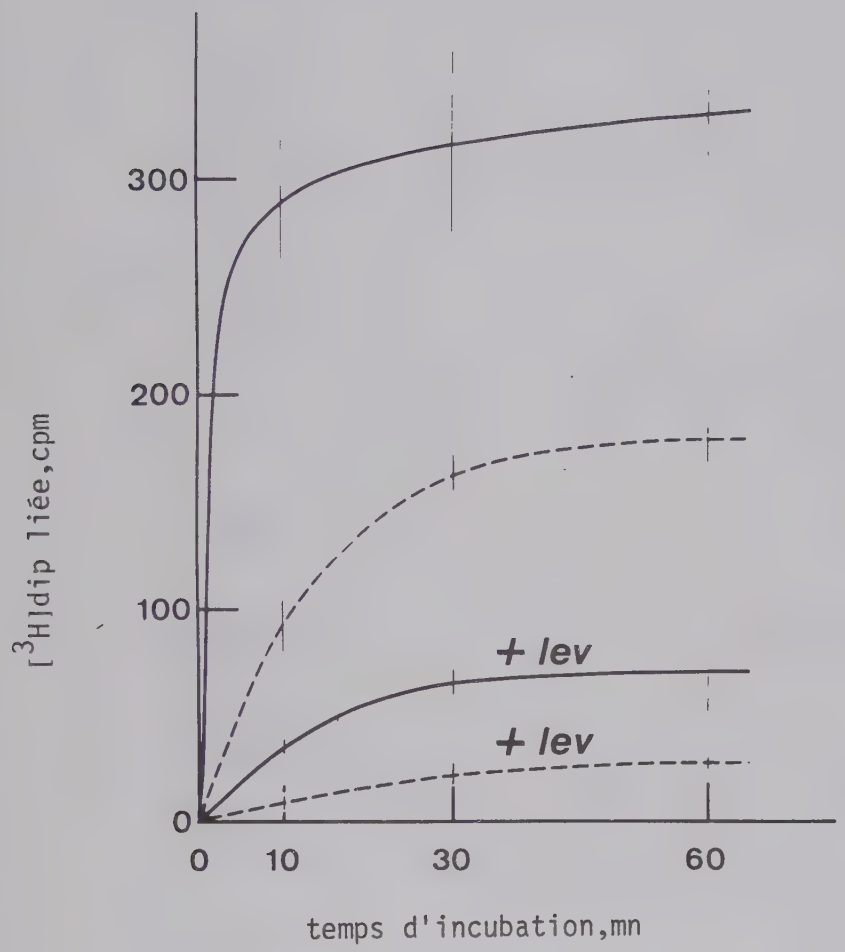


figure 4 : Cinétiques de liaison de la [^{3}H]diprénorphine 1nM (lignes continues et 0,3 nM (lignes en pointillées) aux coupes de 20 µM d'épaisseur de cervelet de lapin, en absence et en présence de levorphanol 10^{-6}M (+ lev). Les coupes sont incubées pendant les temps indiqués et lavées pendant 10 minutes. Chaque point représente la moyenne, $\pm$ déviation standard, de valeurs obtenues sur trois coupes, exprimées en cpm/coupe.

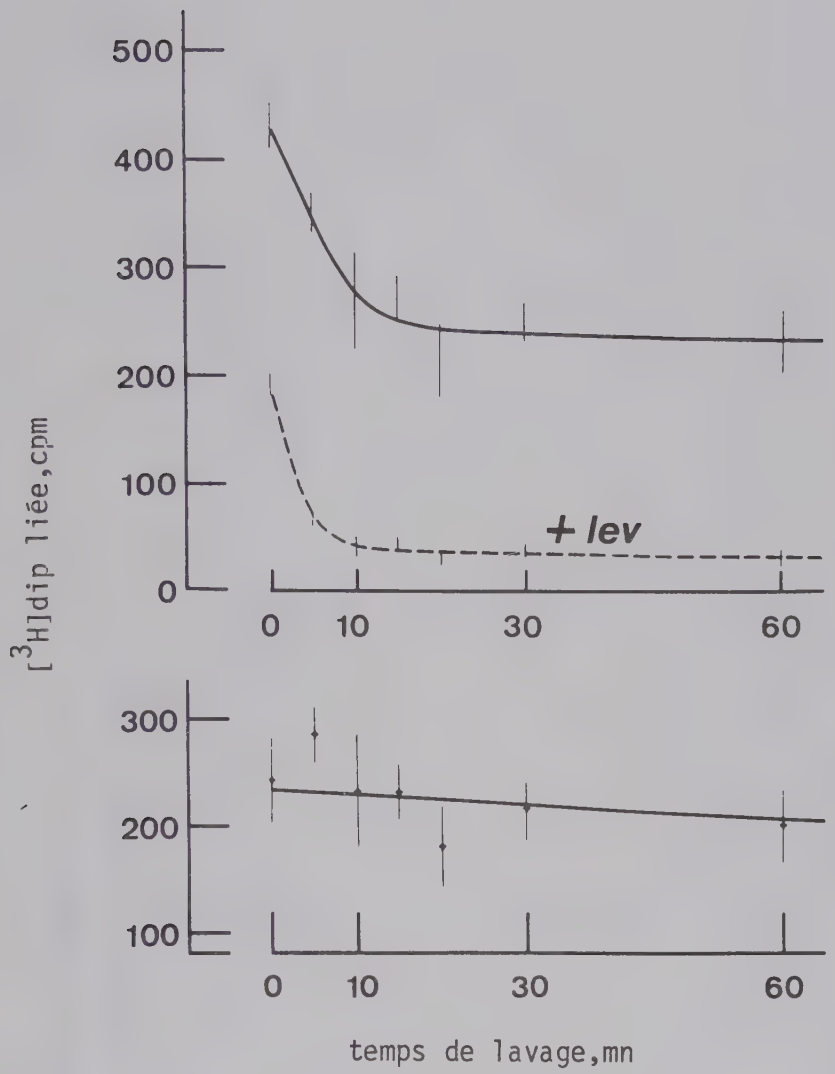


figure 5 : Cinétique de lavage des coupes incubées avec la [^{3}H]diprenorphine (1nM) pendant 30 minutes à température ambiante, avec et sans levorphanol 10^{-6}M (courbe +"lev"). Chaque point représente la moyenne, $\pm$ déviation standard, de valeurs obtenues sur trois coupes, exprimées en cpm/coupe.

La figure inférieure représente la différence, point par point, des deux courbes précédentes ; c'est-à-dire la radioactivité liée spécifiquement par coupe.

TABLE 6 :

	Densité du marquage par la [^{3}H]diprenorphine (nombre de grains / 500 µm^2)				Densité relative à la couche moléculaire
	+ Dextrorphan 10^{-6}M (10)	+ Levorphanol 10^{-6}M (10)	Aucune addition (90)	Variation régionale extrême	
Couche moléculaire	12,7	1,3	12,3	7,5 - 20,5	1
Couche granulaire	8,1	0,6	6,5	3,5 - 12	0,53
Substance blanche	1,8	0,6	1,6	0,5 - 2,5	0,13

Densité du marquage par la[^{3}H]diprenorphine (1 nM) sur les autoradiographies de coupes de 5 µM d'épaisseur de cervelet de lapin, après 8 semaines d'exposition. Les valeurs représentent la moyenne de comptages indépendants, sur une grille de 3500 µm^2, dont le nombre est indiqué entre parenthèses. L'autoradiographie a été réalisée sur des coupes marquées en 1 nM [^{3}H]diprenorphine en présence ou non de dextrorphan et de levorphanol 10^{-6} M.

supérieure au bruit de fond obtenu par la méthode employée. La densité du marquage dans la couche moléculaire est environ 10 fois plus importante que dans la substance blanche et deux fois plus que dans la couche granulaire (table 6). Les grains d'argent sont répartis de manière uniforme (photo 2) au sein de chaque couche, tant sur les coupes sagittales que coronales. On observe cependant une faible densité des grains d'argent au niveau des corps cellulaires colorés au bleu de toluidine, dans la couche moléculaire comme dans la couche granulaire. De même, aucun marquage n'est observé sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje.

Les variations régionales de densité du marquage sont de faible amplitude, on note que dans chaque région anatomique, la densité relative du marquage entre les différentes couches est la même.

La distribution des sites de liaison de la [^{3}H] étorphine est identique à celle observée avec la [^{3}H] diprénorphine.

III.3.4. DISCUSSION

La localisation des sites récepteurs des opiacés par autoradiographie a été généralement étudiée après marquage des sites *in vivo* (Pert et al, 1975 ; Atweh et kuhar, 1977, a, b, c ; Pert et al, 1976). La distribution du ligand radioactif dans les tissus est soumis *in vitro* à des influences non spécifiques, comme le flot sanguin, la solubilité de la drogue dans les lipides, son ionisation, qui entrainent des rapports liaison spécifique sur non spécifique faibles.

La technique de marquage *in vitro* que nous avons utilisée permet d'obtenir un marquage important en ne necessitant que de faible quantité de produit radioactif, dans des conditions contrôlées, maintenant un rapport liaison spécifique sur non spécifique élevé.

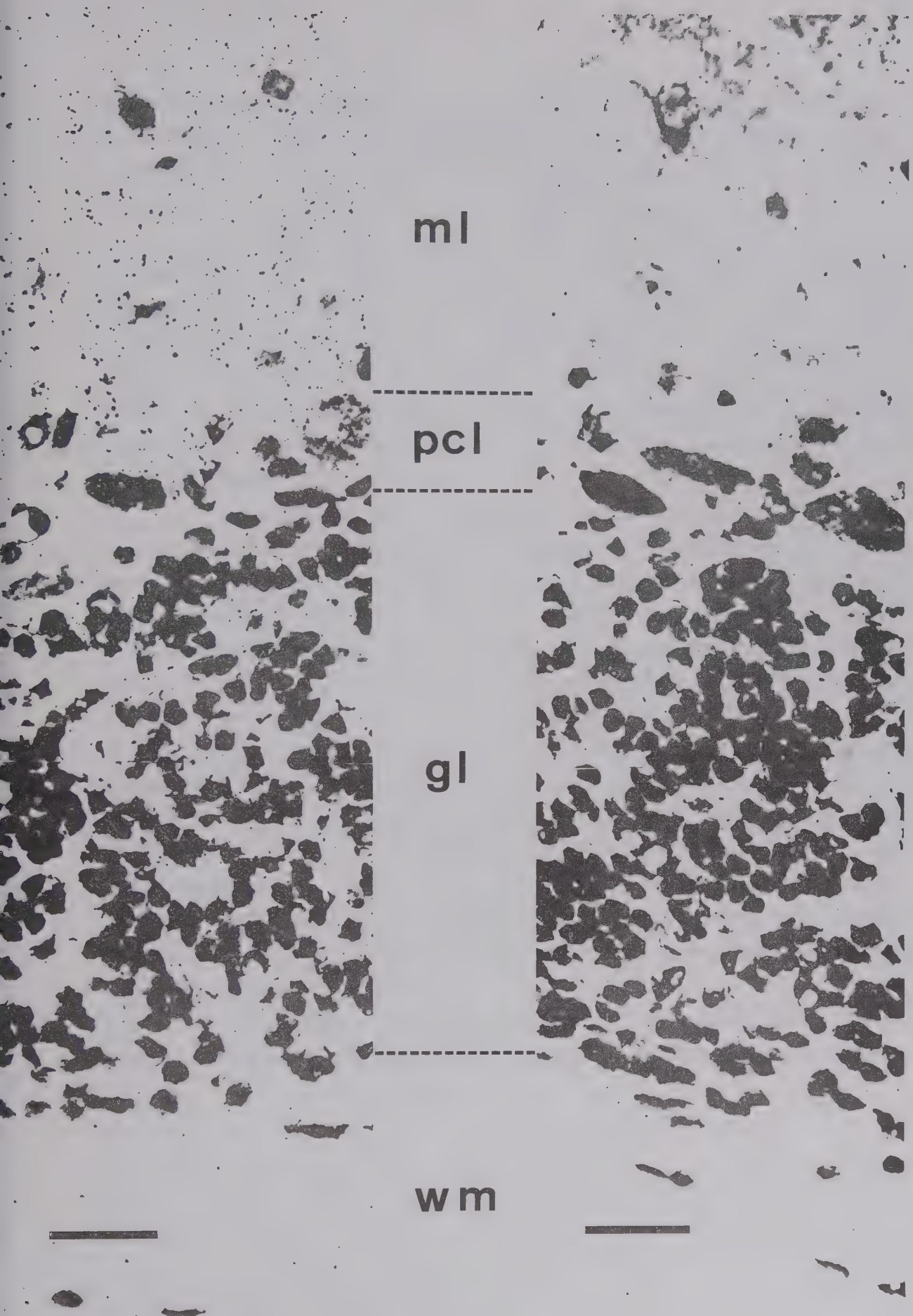
La liaison des opiacés à leurs sites récepteurs fait intervenir des interactions faibles, réversibles ; il est donc nécessaire de minimiser les risques possibles de translocation de la drogue, lors de la préparation des autoradiogrammes (Stumpf et Roth, 1966). Dans ce but nous avons utilisé des opiacés, agoniste et antagoniste, possédant de faibles constantes de dissociation (0,1 - 0,2 nM) et confronté les résultats de techniques différentes capables de limiter la diffusion du ligand lors du contact avec l'émulsion photographique : 1) protection par un film de nitrocellulose hydrophobe, imperméable, des coupes marquées, fixées ou non au glutaraldéhyde 2) utilisation d'une émulsion sèche, apposée contre les coupes marquées

photo 2 : Autoradiographie de vermis de cervelet de lapin (coupe sagittale, 5 µM d'épaisseur), marquée par la [^{3}H]diprenorphine 1 nM.

Reconstitution montrant les trois couches du cortex cerebelleux. On observe une haute densité de grains dans la couche moléculaire (ml) modérée dans la couche granulaire (gl) et très faible dans la substance blanche (wm).

Temps d'exposition : 8 semaines. La barre représente 25 µm. Pcl : couche des cellules de Purkinje.

(A droite), le marquage par la [^{3}H]diprenorphine a été réalisé en présence de levorphanol 10^{-6}M; les autoradiogrammes ne montrent alors que très peu de grains, indiquant aussi le faible niveau du bruit de fond.


ml
pcl
gl
wm

déshydratées. Dans tous les cas, la distribution du marquage est identique. D'autre part, le fait qu'une différence brutale de densité du marquage s'observe entre la substance blanche et la couche granulaire, suggère que la diffusion du ligand est très certainement un phénomène de faible amplitude.

Plusieurs observations suggèrent que la distribution des grains autoradiographiques représente bien la localisation des sites récepteurs des opiacés : 1) le marquage des coupes de cervelet par la [^{3}H] diprénorphine et la [^{3}H] étorphine est stéréospécifique, 2) la densité du marquage dépend de la structure histologique, 3) la densité relative du marquage entre les différentes couches du cortex est identique à la concentration relative des sites de liaison de la [^{3}H] étorphine dosée après microdissection des couches (*III.1.4.*).

La faible densité du marquage dans la substance blanche et au niveau des corps cellulaires montre que les sites récepteurs des opiacés sont des composants neuritiques. Il est difficile, toutefois, de les assigner à un type cellulaire particulier. Les neurones intrinsèques et les fibres afférentes forment des contacts synaptiques massivement dans une seule couche du cortex. La présence simultanée des sites récepteurs des opiacés dans les couches granulaire et moléculaire indique donc, dans l'hypothèse où ces sites seraient post-synaptiques, leurs relation avec plusieurs types cellulaires. Toutefois le rôle de neuromodulation actuellement attribué aux encéphalines (Atweh et al, 1978 ; Lamotte et al, 1976 ; Hiller et al, 1978), et la localisation pré-synaptique des sites opiacés (Arbilla et Langer, 1978 ; Jessel et Iversen, 1977 ; Mudge et al, 1979 ; Pollard et al, 1977) qui s'y associe, rend cette situation plus complexe à interpréter. Plusieurs types de sites pré et post-synaptiques peuvent en outre coexister.

L'utilisation d'autres techniques, l'autoradiographie en microscopie électronique, notamment, peut permettre de résoudre ce problème.

III.4. DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DU "CERVEAU" ET DU CERVELET DE LAPIN.

III.4.1. INTRODUCTION

Un grand nombre d'évidences expérimentales suggère que les opiacés exercent leurs effets par l'altération de la transmission synaptique au niveau des structures cérébrales. Les études préliminaires de Pert et Snyder (1974) et de Terenius (1973) de fractionnement subcellulaire d'homogénats de cerveau de rat montrent effectivement que les sites récepteurs des opiacés sont concentrés, préférentiellement, au niveau des terminaisons nerveuses. Repris en détail par Smith et Loh (1976), ce type d'expérience, révèle en fait une distribution beaucoup plus diffuse des sites sur toute la surface des neurones.

Nous avons pensé que, du fait de sa cytoarchitecture simple et relativement homogène, le cervelet se prêterait mieux que le cerveau à ce type d'approche. C'est pourquoi nous avons comparé, par les méthodes de fractionnement classiques, la distribution des sites récepteurs des opiacés dans les fractions subcellulaires de "cerveau" et de cervelet.

III.4.2. DISTRIBUTION DANS LES FRACTIONS NUCLEAIRE (P1) MITOCHONDRIALE (P2) ET MICROSOMALE (P3)

La table 7 montre la répartition des sites de liaison de la [^{3}H] étorphine (1nM) du "cerveau" et du cervelet entre les fractions: nucléaire (P1), mitochondriale brute (P2) et microsomale (P3).

On observe que la fraction P3 contient 70 % et 60 % des sites de liaison de l'étorphine, respectivement du "cerveau" et du cervelet. Cette fraction possède l'activité spécifique de liaison la plus élevée des trois fractions subcellulaires primaires : plus de deux fois la valeur obtenue avec les homogénats totaux. La fraction mitochondriale brute contient une proportion identique de sites pour les deux types d'homogénats (environ 20 %). Lorsque cette fraction est analysée sur gradient discontinu de sucrose-Ficoll, on observe un enrichissement en sites de liaison dans la fraction synaptosomale. L'interface 7,5-13 % (w:v) Ficoll est en effet la seule ayant une activité spécifique de liaison supérieure (près du double) à celle du P2 (Table 7). L'examen en microscopie électronique confirme la présence de synaptosomes dans cette fraction.

L'interface 0-7,5% et le culot du gradient, enrichis respectivement

TABLE 7

Fraction	"cerveau"		cervelet	
	Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)	Nombre de sites de liaison de la [^{3}H]étorphine en %	Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)	Nombre de sites de liaison de la [^{3}H]étorphine en %
Homogénat	174,5 ± 19,5	P1 + P2 + P3 = 100 %	178,5 ± 27	P1 + P2 + P3 = 100 %
Nucléaire (P1)	87 ± 13,5	11 ± 3,5	134 ± 59	18,5 ± 4
Mitochondriale brute (P2)	111 ± 12	20 ± 1,2	138,5 ± 32	20,5 ± 5,5
Microsomale (P3)	403,5 ± 71	69 ± 4	395 ± 92	62 ± 7,5
Sous fraction du P2		P2 = 100 %		P2 = 100 %
Myelinique	127	29	125,5	27,5
Synaptosomale 1	215	15	239	11
Synaptosomale 2	87,5	2,5	122	2,5
Mitochondriale	37	5,9	41	4,55

Distribution subcellulaire des sites de liaison de la [^{3}H]étorphine (1nM) du "cerveau et du cervelet de lapin. Les valeurs sont les moyennes de dosages indépendants sur 4 animaux pour les fractions subcellulaires P1, P2 et P3 et de 3 animaux pour les sous fractions du P2.

en myeline et en mitochondrie, lient l'étorphine avec des activités spécifiques égale et inférieure à celle obtenue sur le P2.

III.4.3. ESSAI DE LOCALISATION "FINE"

Nous avons recherché les différences fines qui pourraient exister entre les constituants membranaires du "cerveau" et du cervelet portant les sites de liaison de la [^{3}H]étorphine, dans les sous fractions du P2 et du P3. Pour cela, nous avons analysé l'ensemble des gradients utilisés lors du fractionnement après marquage des homogénats par la[^{3}H]étorphine.

Les constituants des fractions P2 du "cerveau" et du cervelet présentent des profils de sédimentation identiques (figure 6). Dans les deux cas, 50 % de la radioactivité sont retrouvés aux interfaces des gradients de Ficoll et dans les culots, dans des proportions identiques à celles obtenues par le dosage biochimique des sites récepteurs (Table 7). La fraction synaptosomale possède le rapport : radioactivité liée spécifiquement sur taux de protéine,le plus élevé. Cette fraction est sous fractionnée, après choc osmotique, sur gradient discontinu de sucrose (figure 7). La radioactivité est présente sur l'ensemble des gradients, de façon similaire pour les fractions du "cerveau" et du cervelet. Aux interfaces 1-0,8 M et 0,8 - 0,6 M de sucrose, notamment,s'accumulent les constituants présentant l'activité spécifique la plus importante et qui cosedimentent donc avec les membranes plasmiques synaptiques (Cotman et Matthews, 1971 ; Gurd et al, 1974 ; Cotman, 1974).

Les fractions P3 ont également été analysées en gradient discontinu de sucrose (figure 8). Elles contiennent des membranes portant les sites de liaison de l'étorphine, de taille hétérogène, sédimentant entre 1,3 et 0,6 M de sucrose, de façon identique pour le "cerveau" et le cervelet. Aucune sous-fraction ne se révèle particulièrement enrichie en sites récepteurs.

III.4.4. DISCUSSION

La répartition des sites de liaison de la [^{3}H]étorphine, des homogénats de "cerveau" et du cervelet, entre les différentes fractions subcellulaires est très similaire. 60 à 70 % des sites récepteurs s'accumulent dans la fraction microsomale P3, fraction qui présente l'activité spécifique de liaison la plus élevée. Une partie des sites se localise, toutefois, sur les terminaisons nerveuses. La fraction synaptosomale, isolée sur gradient de Fi-

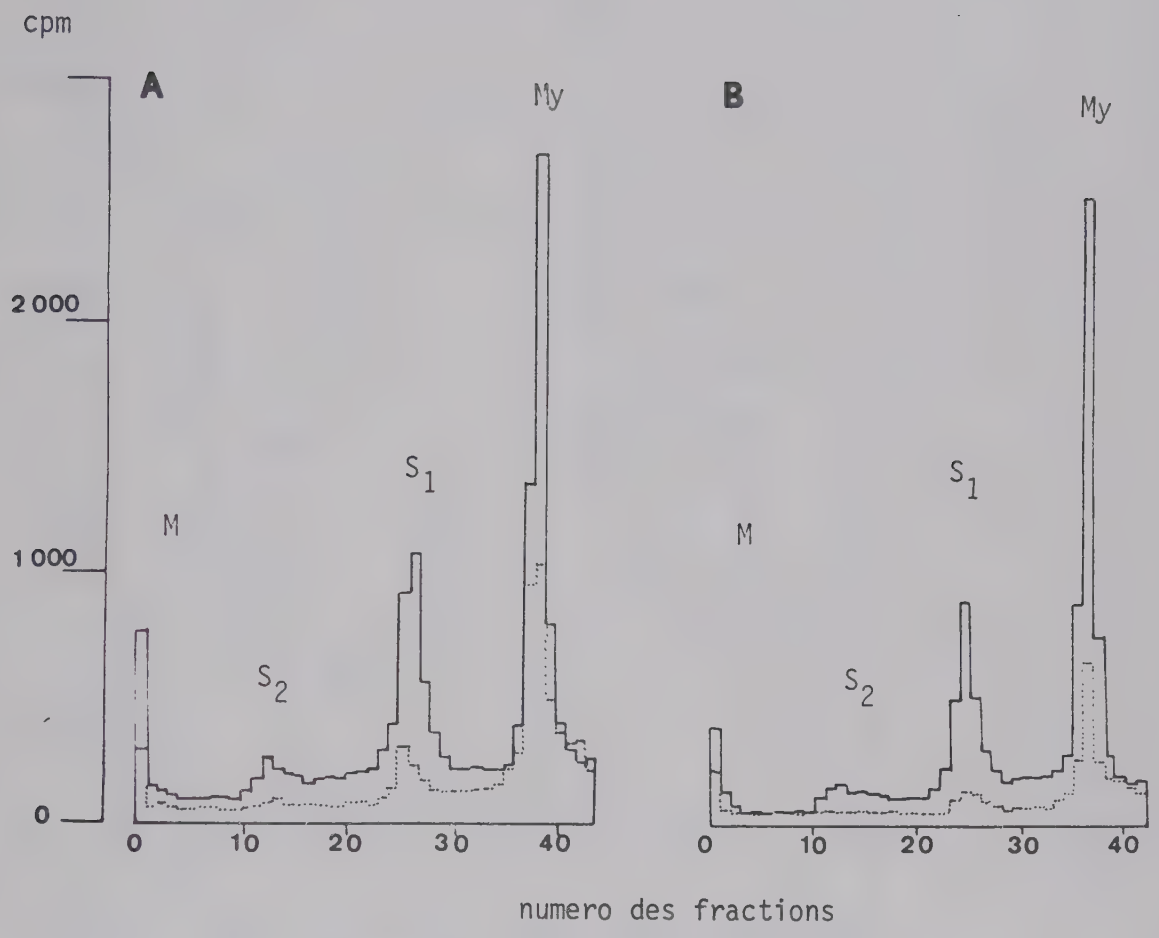


figure 6 : Marquage des sous-fractions du P2 par la [^{3}H]étorphine (2nM) du "cerveau" (A) et du cervelet de lapin (B). Les gradients sont constitués de trois couches de 10 ml de Ficoll ; 17 ; 13 ; 7,5 % sur lesquelles sont déposées les fractions P2. La fraction 1 représente le culot du gradient, le marquage est exprimé en cpm/fraction. Le marquage obtenu en présence de levorphanol 10^{-6}M figure en pointillé. Les interfaces du gradient sont enrichies en mitochondrie (M), synaptosome (S_1 et S_2) et en myeline (My).

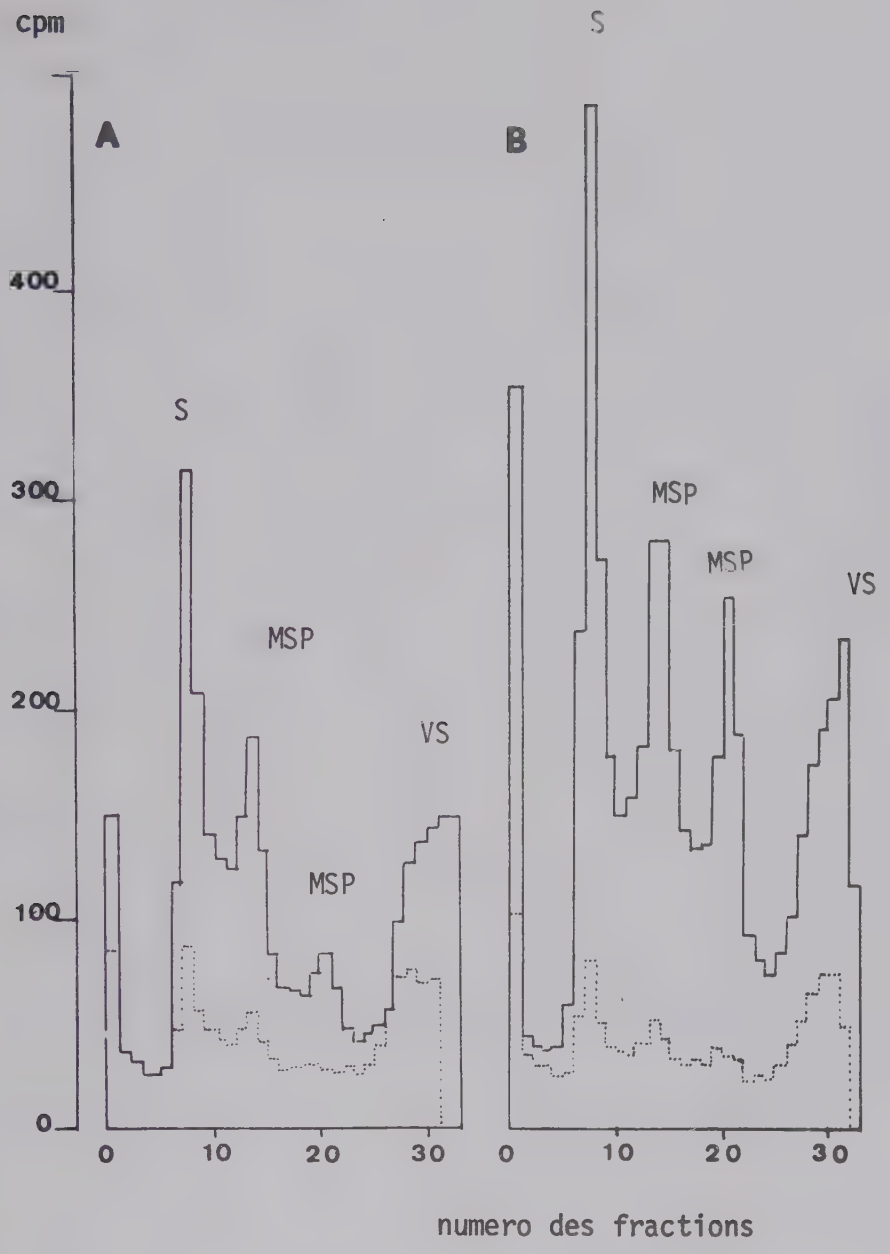


figure 7 : marquage des sous-fractions synaptosomales par la [^{3}H]étorphine (2nM) du "cerveau" (A) et du cervelet (B) de lapin. Les gradients sont constitués de 4 couches de 3 ml chacune ; 1,3 ; 1,0 ; 0,8 ; 0,6 M sucrose sur lesquelles sont déposées les fractions synaptosomales lysées. La fraction n° 1 représente le culot du gradient. En pointillé, le marquage obtenu en présence de levorphanol 10^{-6}M. Les interfaces du gradient sont enrichies en synaptosome (S), menbrane synaptique plasmique (MSP) et en vésicule synaptique et en microsomes (VS).

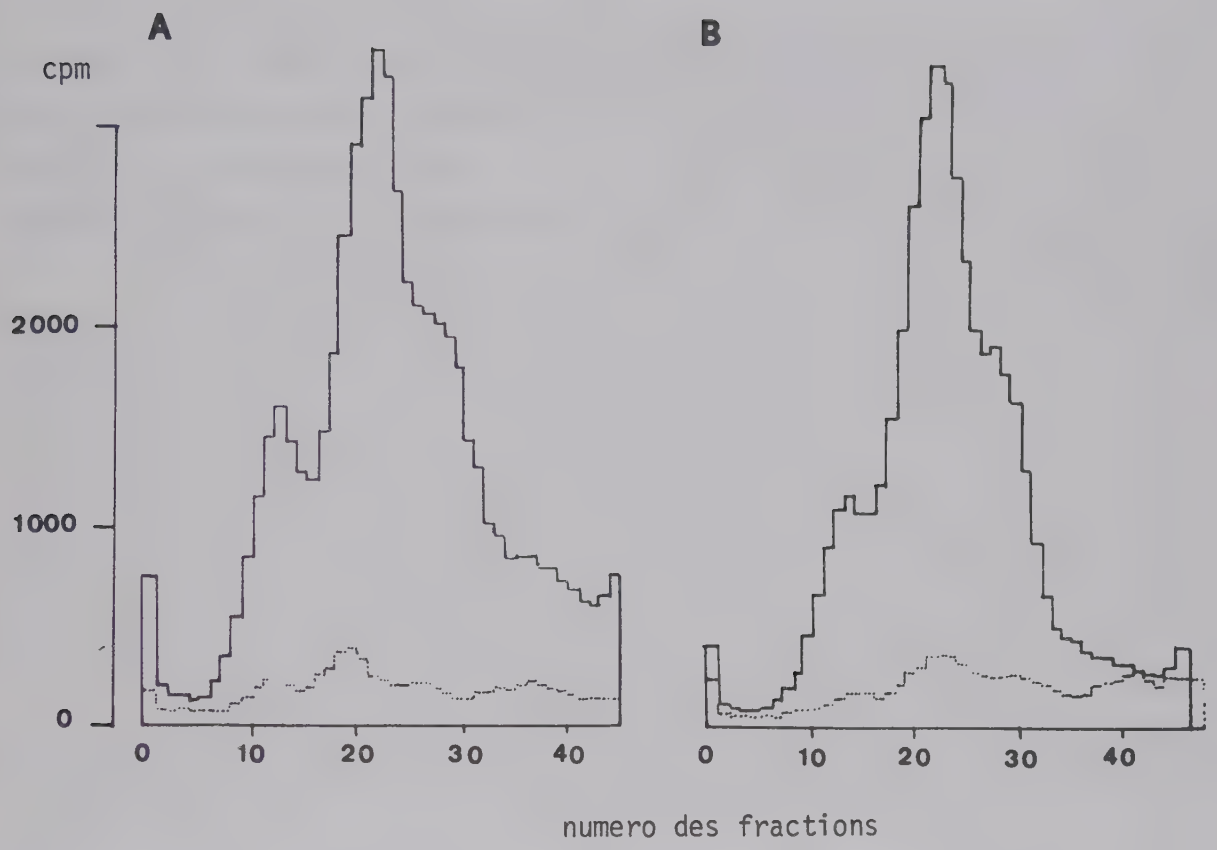


figure 8 : marquage des sous-fractions du P3 par la [^{3}H]étorphine du "cerveau" (A) et de cervelet (B) de lapin. Les gradients sont constitués de 4 couches de 8 ml chacune ; 1,3 ; 1,0 ; 0,8 ; 0,6 M sucrose sur lesquelles sont déposées les fractions P3. La fraction n° 1 représente le culot du gradient, le marquage obtenu en présence de levorphanol 10^{-6}M figure en pointillé.

coll , puis les fractions contenant les membranes synaptiques plasmiques dérivées des synaptosomes, sont en effet, les seules sous-fractions du P2 enrichies en sites de liaison.

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Smith et Loh (1976). Les résultats antérieurs de Pert et Snyder (1974) montrant la présence de 50 % des sites récepteurs des opiacés dans la fraction mitochondriale brute, semblent dus, pour une bonne part, à l'utilisation d'une fraction non lavée largement contaminée par des membranes issues du réticulum endoplasmique (Gurd et al., 1974) et donc par des sites sédimentant normalement dans le P3.

La fraction microsomale ne contient pas, isolée par la technique que nous avons employée, d'activité enzymatique habituellement associée aux synaptosomes (Gurd et al, 1974). Il est donc peu vraisemblable que les sites de liaison de l'étorphine de cette fraction soient portés par une classe particulière de membrane synaptique plasmique. En revanche, la fraction microsomale contient des membranes plasmiques et la haute activité spécifique de liaison observée dans cette fraction reflète certainement une localisation diffuse sur la surface cellulaire des neurones (Smith et Loh, 1976).

En définitive, ces données apportent peu sur la localisation précise des sites récepteurs des opiacés. Si une partie de ceux-ci est synaptique, il est impossible de dire si la plus grande part est issue d'un type cellulaire particulier et lequel.

Ce manque de résolution des techniques classiques de fractionnement subcellulaire est liée à l'hétérogénéité même des structures cérébrales. L'homogénéité de structure du cervelet, au contraire, à permis l'isolement et la caractérisation de particules mieux définies ; 1) au niveau histologique, par la purification des fibres parallèles de la couche granulaire (Mikoshiba et Changeux, 1978), 2) au niveau cellulaire, par la séparation des différents types cellulaire du cervelet en développement (Sellinger et al., 1974 ; Cohen et al., 1978), 3) au niveau subcellulaire, par la purification des glomerules (Hajos et al., 1974). L'utilisation de ces techniques devrait se révéler, sans doute, plus intéressante dans l'étude de la localisation des sites récepteurs des opiacés.

III.5. EFFETS DES LESIONS PAR L'ACIDE KAINIQUE SUR LES SITES RECEPTEURS DES OPIACES DANS LE CERVELET DE LAPIN.

III.5.1. INTRODUCTION

Un moyen de localiser les sites récepteurs des opiacés est de détruire sélectivement le(s) type(s) cellulaire(s) au(x)quel(s) ils sont associés. L'acide kainique, un analogue rigide du glutamate, induit dans le cervelet des rongeurs (Herndon et Coyle, 1977 ; Vinh Tan Tran et Snyder, 1979), la dégénérescence rapide des neurones intrinséques innervés par les cellules des grains : Purkinje, étoilées, en panier et Golgi II. L'acide kainique induit-il les mêmes effets chez le lapin et dans ces conditions que deviennent les sites récepteurs des opiacés ?

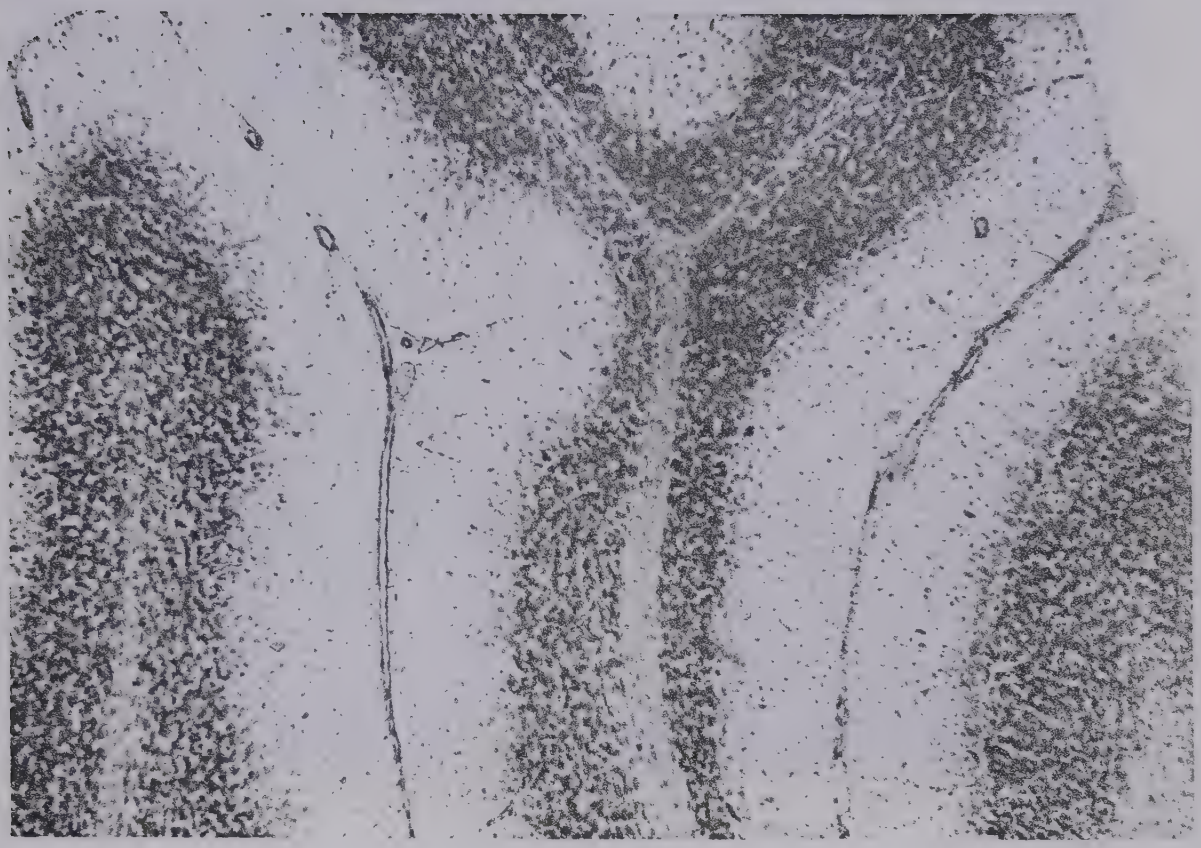
III.5.2. OBSERVATIONS CLINIQUES

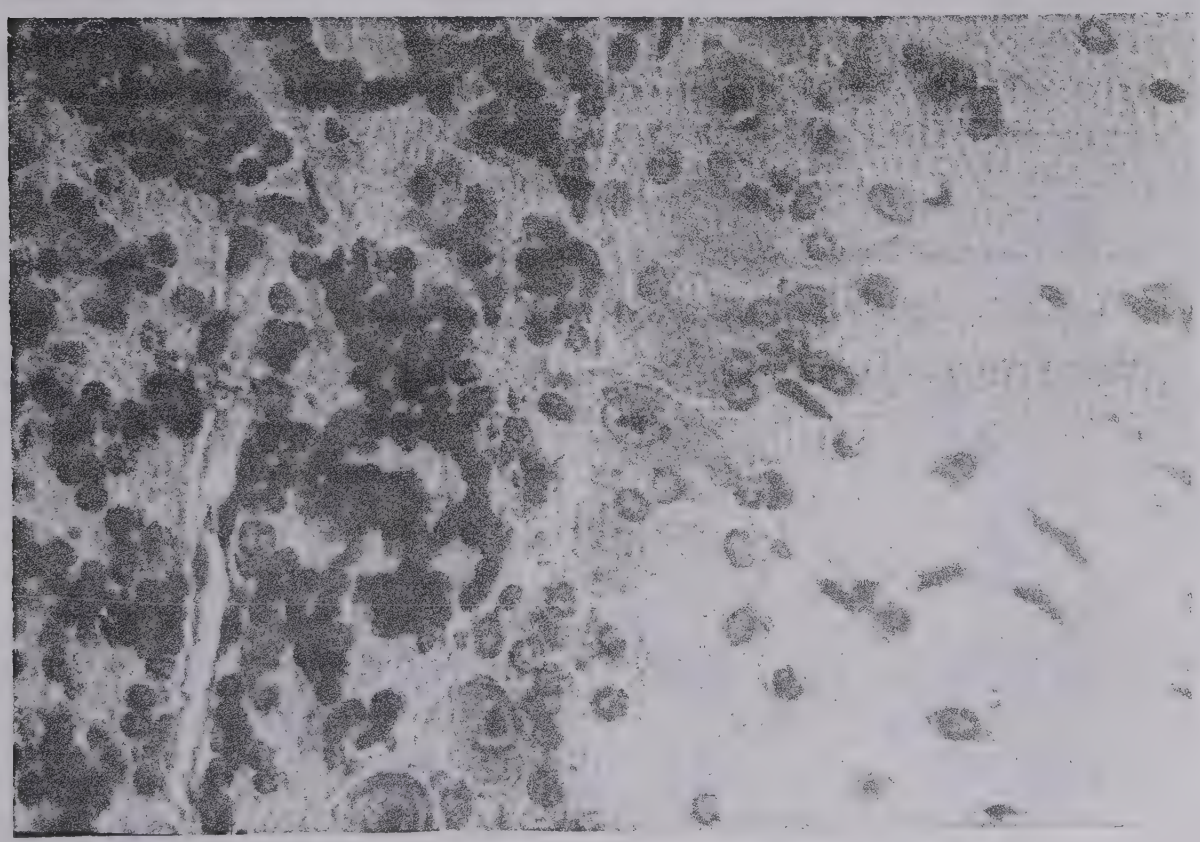
Immédiatement au réveil, rien ne permet de distinguer les animaux témoins (traités à l'α-méthyl aspartate, 12 µg) d'animaux non opérés. Station et locomotion paraissent normales. En revanche, les animaux ayant reçu de l'acide kainique (12 µg) présentent, pendant 24-48 heures, des troubles graves identiques à ceux observés chez le chat ou le chien après extirpation totale du cervelet (Morin, 1974) : ils gisent sur le flanc, station et locomotion sont impossibles ; une hypertonie d'extension est manifeste qui affecte la nuque et surtout le rachis et les pattes. Au cours de cette période les animaux subviennent difficilement à leurs besoins nutritionnels. Les troubles les plus graves régressent plus ou moins rapidement et une semaine après l'opération, il ne subsiste plus que de légers problèmes d'équilibration et une hypertonie d'extension du train postérieur manifestée surtout lorsque l'on sollicite l'animal.

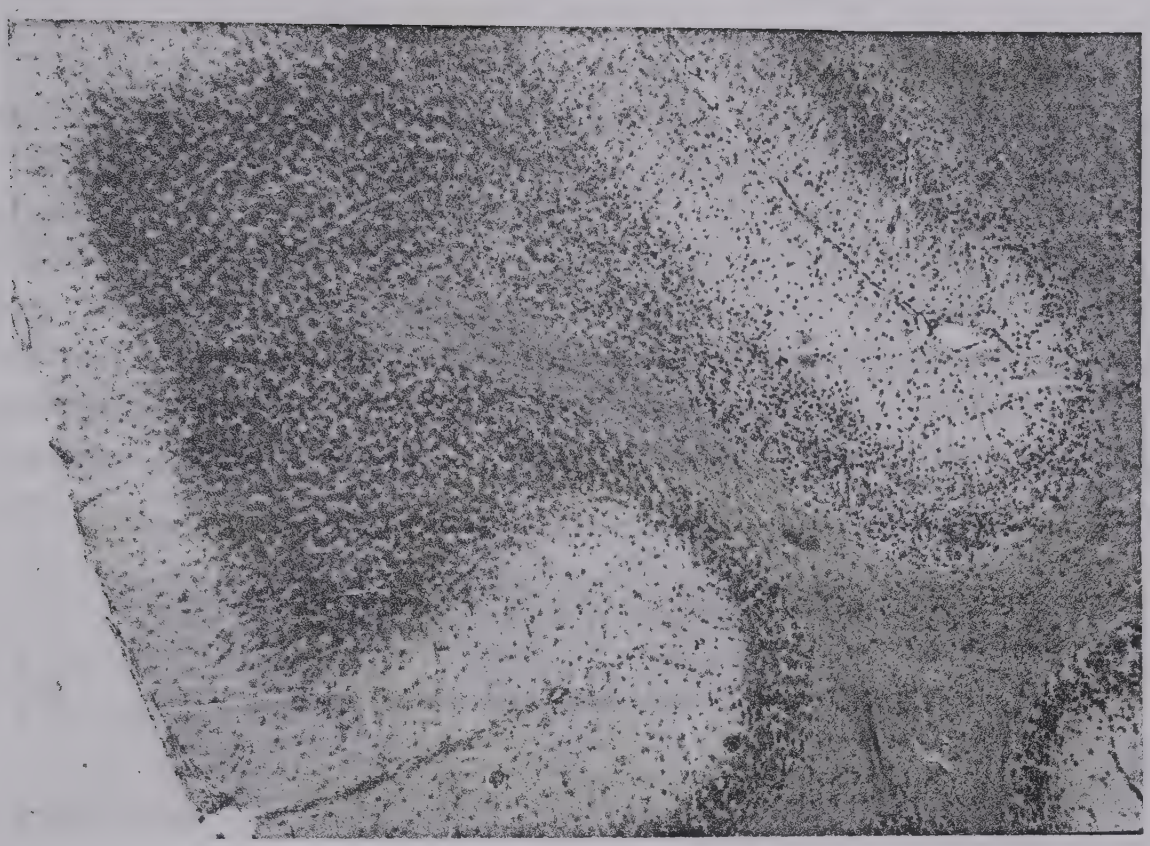
III.5.3. ANALYSE HISTOLOGIQUE

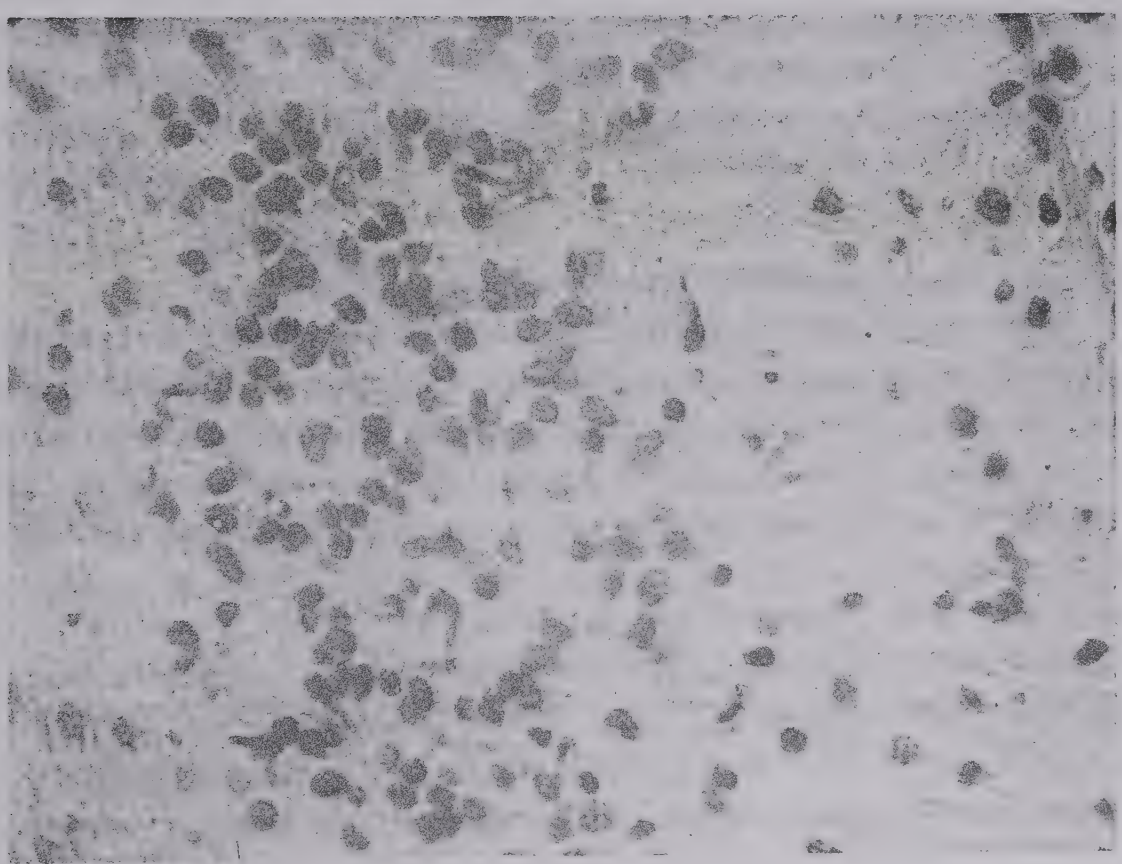
Deux semaines après l'opération, l'examen macroscopique du cervelet des animaux ayant reçu l'acide kainique ne révèle aucune différence morphologique notable par rapport aux témoins. Cependant, le poids de l'organe et son contenu en protéine ont légèrement diminués. L'examen microscopique révèle les lésions provoquées par l'acide kainique (photographie n° 3). Au voisinage du site d'injection (lobule 4, c ; nomenclature de Brodal, 1940), le tissu présente un aspect lacunaire : toutes les cellules de Purkinje ont

Photo 3 : Coupes histologiques de cervelet de lapin 15 jours après injection d'acide kainique (12 µg).
En haut : grossissement 60 fois, en bas : grossissement 600 fois.
La première page montre l'aspect du lobule 2; la structure du tissu est identique à celle des animaux témoins. A fort grossissement, à gauche la couche granulaire, à droite la couche moléculaire, entre les deux : les cellules de Purkinje.
La deuxième page montre l'aspect du lobule c. A faible grossissement on observe surtout une diminution de l'épaisseur de la couche moléculaire. A plus fort grossissement, on note l'absence de cellule de Purkinje, une diminution de la densité des cellules des grains et un apparent développement des fibres de Bergmann dans la couche moléculaire.









disparu, la couche moléculaire est vacuolisée, seules les cellules des grains et les cellules de Bergmann sont relativement bien conservées. L'action cytotoxique de l'acide kainique est d'autant moins manifeste que l'on est éloigné du site d'injection. Aussi l'aspect histologique des paraflocculi semble-t-il intact. De la même façon, on n'observe aucune dégénérescence cellulaire dans le cervelet des animaux traités à l'α-méthyl aspartate, même au voisinage immédiat du site d'injection. Ces observation sont en excellent accord avec celles de Herndon et Coyle (1977) et de Vinh Tan Tran et Snyder (1979).

III.5.4. DOSAGE DES SITES RECEPTEURS DES OPIACES

Nous avons dosé les sites de liaison de la [^{3}H]étorphine dans neuf régions anatomiques du cervelet des animaux traités à l'acide kainique et à l'α-méthyl aspartate.

La densité en sites récepteurs des opiacés diminue chez les animaux ayant reçu l'acide kainique, d'une façon variable d'une région à l'autre, en relation avec l'importance des lésions révélées par l'examen histologiqué (table 8). Dans les paraflocculi, les hémisphères et dans les lobules a et b, on note une légère diminution (20 - 30 %) du nombre de sites de liaison de l'étorphine, par rapport aux témoins. En revanche, les lobules voisins du site d'injection de l'acide kainique, c'est-à-dire 3,4 et c ont perdu respectivement 76,82 et 87 % des sites récepteurs des opiacés comparativement aux lobules correspondants du cervelet d'animaux contrôles (α méthyl aspartate).

III.5.5. DISCUSSION

L'acide kainique possède des effets neuroexcitateurs supérieurs à ceux de son analogue de structure, le glutamate (Olney et al, 1974), il possède en outre des propriétés cytotoxiqueset peut détruire sélectivement des cellules neuronales en microinjection intratissulaire (Coyle et Schwarcz, 1976 ; McGeer et McGeer, 1976). Dans le cervelet de rat et de hamster, l'acide kainique provoque la destruction des cellules de Purkinje, en panier, étoilées et de Golgi (type II), sans altérer pratiquement les cellules de grains (Herndon et Coyle, 1977 ; Vinh Tan Tran et Snyder, 1979). Les résultats que nous présentons, quoique préliminaires, montrent que l'acide kainique produit bien les mêmes effets chez le lapin. Les lésions qu'il induit sont immédiatement visibles à l'examen histologique très près du site d'injection, il diffuse cependant dans le cervelet puisque ses effets s'enregistrent jus-

TABLE 8 :

	mg proteine		Activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (fmoles/mg de protéine)		femtomoles totales	
	αMAA	KA	αMAA	KA	αMAA	KA
lobule a	1,84 ± 0,14	1,6 ± 0,2	81,35 ± 27,9	69,43 ± 33	152,09 ± 60	108,9 ± 51
" b	4,82 ± 1,04	4,36 ± 0,26	142,02 ± 11,9	129,89 ± 39	693,5 ± 207	565 ± 161
" c	10,48 ± 1,76	5,08 ± 0,7	179,25 ± 28	48,35 ± 15	1882,75 ± 464	243 ± 69
" 1	1,18 ± 0,36	1,39 ± 0,6	110,21 ± 21,3	69,33 ± 49	125,8 ± 28	75 ± 34
" 2	2,89 ± 1,5	2,07 ± 0,6	132,62 ± 28,4	105,11 ± 18	406 ± 315	211 ± 31
" 3	4,14 ± 0,78	2,27 ± 0,37	162,89 ± 31,5	73,9 ± 26	688 ± 260	106 ± 51
" 4	5,73 ± 1,2	2,47 ± 0,44	114,66 ± 5,8	47,8 ± 22,6	660 ± 157	121 ± 68
H	29,61 ± 4,2	24,58 ± 1,6	164,56 ± 25	129,6 ± 6,5	4892 ± 1183	3592 ± 915
PF	13,19 ± 2,6	9,76 ± 2,6	194,04 ± 30	195,3 ± 21	2598 ± 798	1923,8 ± 617

Quantité de protéines, quantité de sites de liaison et activité spécifique de liaison de la [^{3}H]étorphine (1nM) dans les différentes régions anatomiques du cervelet de lapin traité à l'αméthylaspartate (αMAA) et à l'acide kainique (KA). Chaque valeur représente la moyenne, ± déviation standard, de dosages indépendants sur trois animaux. H : hémisphère ; PF : paraflocculus.

que dans les hémisphères. Outre les troubles de locomotion et les dégats histologiques qu'il occasionne, l'acide kainique provoque une diminution du nombre de sites de liaison de l'étorphine. Cette diminution est d'autant plus importante que la région considérée est près du site d'injection. Cet effet ne peut être imputé uniquement à une cytotoxicité non spécifique, d'abord parce que les cellules des grains et les cellules gliales ne sont pas atteintes chez le rat et le hamster, de même que chez le lapin ; ensuite parce que nous constatons dans certaines régions où la structure du tissu est apparemment intact, comme le lobule 1, une diminution du nombre de sites récepteurs des opiacés.

La sensibilité différentielle des neurones du cervelet à l'acide kainique est en accord avec l'idée que ce neurotoxique excerce ses effets via les récepteurs du glutamate localisés sur les neurones postsynaptiques des terminaisons glutaminergiques (Herndon et Coyle, 1977). Les cellules du cervelet atteintes par l'acide kainique, sont en effet, toutes innervées par les fibres parallèles et l'acide glutamique est très certainement le neurotransmetteur libéré par ces fibres (Young et al, 1974 ; McBride et al, 1976 ; Valcana et al, 1972). En outre, il est vraisemblable que toutes les cellules du cervelet sensibles à l'acide kainique sont GABAergiques (Herndon et Coyle, 1977 ; Vinh Tan Tran et Snyder, 1979). Il n'est donc pas impossible que, du fait de la disparition simultanée de ces neurones et des sites de liaison de la [^{3}H] étorphine, l'action des encéphalines s'exerce au niveau de la transmission GABAergique, du moins dans le cervelet de lapin (voir Conclusion Générale).

IV - CONCLUSION GENERALE

Nous avons montré, résultat essentiel, que le cervelet des lagomorphes, contrairement à celui des rongeurs, est riche en sites de liaison de l'étorphine tritiée. Ce fait est assez surprenant en soi, puisque l'organisation du cervelet est remarquablement stéréotypée chez les vertébrés et l'on peut se demander à quelles variations structurales on peut relier ces différences interspécifiques. Il faut se rappeler en fait, que si le cervelet des rongeurs possède peu de sites récepteurs des opiacés, il n'en est pas totalement dépourvu. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de postuler l'existence de voies nerveuses et de fonctions différentes entre les rongeurs et les lagomorphes, seules des variations purement quantitatives interviennent vraisemblablement.

Nous avons montré que ces sites ont les propriétés caractéristiques de véritables sites récepteurs des opiacés. Au cours de l'ontogénèse du système nerveux central, leur développement rapide est parallèle à la croissance globale du cervelet, sans que l'on puisse le relier à un événement morphogénétique particulier. Les sites récepteurs sont localisés dans le cortex cérébelleux, dans les couches granulaire et moléculaire ce qui suppose qu'ils sont portés par au moins deux types cellulaires distincts. Leur absence au niveau des corps cellulaires suggère une localisation neuritique. Une partie de ces sites, lors des études de fractionnement subcellulaire, cosédimente avec les synaptosomes. Enfin, ces sites semblent être portés par une ou plusieurs classes de neurones intrinséques, sensibles à l'acide kainique et GABAergiques (voir plus loin).

Nous ne sommes pas encore parvenus à définir avec quel(s) type (s) cellulaire(s) particulier(s) ils sont associés. De même, il reste à déterminer quel(s) type(s) de neurone(s) innerve(nt) ces sites récepteurs et notamment si il s'agit de neurones intrinsèques ou afférents. Des expériences préliminaires (non rapportées ici) de localisation des encéphalines par histoimmunofluorescence dans le cervelet de lapin n'ont, pour des raisons techniques, pas encore abouti.

La localisation des sites récepteurs des opiacés du cervelet n'a de véritable intérêt que dans la mesure où elle permet d'approcher l'organisation des différentes fonctions neuronales associées aux dits sites.

Ainsi, nos expériences de lésion par l'acide kainique - dont l'effet cytotoxique sur le cervelet des mammifères est parfaitement défini (destruction sélective des neurones innervés par les fibres parallèles) - suggèrent-elles que 1) les sites encéphalinergiques sont associés à l'un des quatre types neuronaux suivants : Purkinje, en panier, étoilé et Golgi type II 2) les encéphalines modulent, d'une façon ou d'une autre, l'inhibition GABAergique dans cette partie du cerveau, étant donné que ces quatre types neuronaux utilisent le GABA comme neurotransmetteur.

A ce sujet, il est intéressant de noter que les résultats de travaux récents font intervenir implicitement ou explicitement le GABA dans les mécanismes de l'analgésie par la morphine :

1 - il existe des terminaisons GABAergiques présynaptiques aux terminaisons afférentes sensorielles primaires dans la substance gélatineuse de Rolando de la moelle épinière du rat. (Barber et al, 1978) .

2 - l'administration systémique de morphine chez le rat provoque une augmentation du contenu de GABA et de l'activité L-glutamate decarboxylase dans la moelle épinière et le thalamus (Kuriyama et Yoneda, 1978).

3 - le muscimol, un agoniste de GABA, stimule l'effet analgésique de la morphine (Biggio et al, 1977). Cependant, d'autres auteurs (Schell-Krüger et al, 1978) affirment que la même dose de muscimol n'a pas d'effet sur l'analgésie morphinique. Enfin, Mantegazza et al (1979) ont montré que ce même composé, injecté cette fois en intraventriculaire, antagonise les effets antinociceptifs de la morphine.

Ces résultats, même si certains sont controversés, sont en évident accord avec les nôtres. Ils accréditent la thèse que nous avons développée, à savoir que le cervelet des lagomorphes est un organe particulièrement propice à l'analyse des mécanismes encéphalinergiques.

V - B I B L I O G R A P H I E

- Arbilla, S. and Langer, S.Z., Morphine and beta-endorphine inhibit release of noradrenaline from cerebral cortex but not of dopamine from rat striatum, *Nature*, 271 (1978) 559-561.
- Atweh, S.F. and Kuhar, M.J., Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and Lower medulla, *Brain Research*, 124 (1977,a) 53-56.
- Atweh, S.F. and Kuhar, M.J., Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brainstem, *Brain Research*, 129 (1977, b) 1-12.
- Atweh, S.F. and Kuhar, M.J., Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. III. The telencephalon, *Brain Research*, 134 (1977,c) 393-405.
- Atweh, S.F., Murrin, L.C. and Kuhar, M.J., Presynaptic localization of opiate receptors in the vagal and accessory optics systems : an autoradiographic study, *Neuropharmacol.*, 17 (1978) 65-71.
- Audigier, Y., Malfroy-Camine, B.R. and Schwartz, J.C., Binding of ^{3}H-leu-enkephalin in rat striatum : partial inhibition by morphine or naloxone, *Eur. J. Pharmacol.*, 41 (1977) 247-248.
- Barber, R.P., Vaughn, J.E., Saito, K., McLaughlin, B.J. and Roberts, E., GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord, *Brain Research*, 141 (1978) 35-55.
- Barker, J.L., Neale, J.H. and Smith, T.G.Jr, Opioid peptide modulation of amino acid responses on cultured neurons : evidence for a novel type of communication in the CNS, *Science*, 199 (1978) 1451-1453.
- Belluzi, J.D., Grant, N., Garsky, V., Sarontakes, D., Wise, C.D. and Stein, L., Analgesia induced *in vivo* by central administration of enkephalin in rat, *Nature*, 260 (1976) 625-626.
- Biggio, G., Della Bella, D., Frigeni, D. and Guidotti, A., Potentiation of morphine analgesia by muscimol, *Neuropharmac.*, 16 (1977) 149-150.
- Bloom, F.E., Rossier, J., Battenberg, E.L.F., Bayon, A., French, E., Henriksen, S.J., Siggins, G.R., Segal, D., Browne, R., Ling, N. and Guillemin, R., β endorphin : cellular localization, electrophysiological and behavioral effects, In The Endorphins : Adv. Biochem. Psychopharmacol., ed. E. Costa, M. Trabucchi, 1 (1978) 89-110, New York : Raven.
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Birdsall, N.J.M. and Hulne, E.C., C fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors, *Nature*, 260 (1976) 793-795.

- Brodal, A., The cerebellum of the rabbit, a topographical atlas of the folia as revealed in transverse sections, *J. Comp. Neurol.*, 72 (1940) 63-81.
- Chang, J.K., Fong, B.T.W., Pert, A. and Pert, C.B., Opiate receptor affinities and behavioral effects of enkephalin : structure activity relationship of the synthetic peptides analogues, *Life Sci.*, 18 (1976) 1473-1482.
- Clendeninn, N.J., Petraitis, M. and Simon, E.J., Ontological development of opiate receptors in rodent brain, *Brain Research*, 118 (1976) 157-160.
- Cohen, J., Balazs, R., Hajós, F., Currie, D.N. and Dutton, G.R., Separation of cell types from developping cerebellum, *Brain Research*, 148 (1978) 313-331.
- Cotman, C.W. and Matthews, D.A., Synaptic plasma membranes from rat brain synaptosomes : isolation and partial characterization, *Biochim. Biophys. Acta*, 249 (1971) 380-394.
- Cotman, C.W., Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions, Methods in Enzymology, vol. 31, Academic Press (1974) 445-455.
- Coyle, J.T. and Pert, C.B., Ontogenetic development of ^{3}H naloxone binding in rat brain, *Neuropharmacol.*, 15 (1976) 555-560.
- Coyle, J.T. and Schwarcz, R., Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's Chorea, *Nature*, 263 (1976) 244-246.
- Cox, B.M., Golstein, A. and Li, C.H., Opioid activity of a peptide, β-lipotropin-(61-91), derived from β-lipotropin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 (1976) 1821-1823.
- Crain, S.M., Peterson, E.R., Crain, B. and Simon, E.J., Selective opiate depression of sensory evoked synaptic networks in dorsal horn regions of spinal cord cultures, *Brain Research*, 133 (1977) 162-166.
- Creese, I. and Snyder, S.H., Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea pig intestine, *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 194 (1975) 205-219.
- Cuello, A.C. and Paxinos, G., Evidence for a long leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain, *Nature*, 271 (1978) 178-180.
- Eccles, J.C., Ito, M. and Szentagothai, J., The cerebellum as a neuronal machine, Springer, Berlin, 1967.
- Elde, R., Hökfelt, T., Johannson, O. and Terenius, L., Immunohistochemical studies using antibodies to leu-enkephalin : initial observation on the nervous system of the rat, *Neurosci.*, 1 (1976) 349-355.

- Gent, J.P. and Wolstencroft, J.H., Effects of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin compared with those of morphine on brain stem neurones in cat, *Nature*, 261 (1976) 426-427.
- Golstein, A., Lowney, L.I. and Pal, B.K., Stereospecific and non specific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of the mouse brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68 (1971) 1742-1747.
- Guillemin, R., Ling, N. et Burgus, R., Endorphines, peptides, d'origine hypothalamique et neurohypophysaire à activité morphinomimétique. Isolement et structure moléculaire de l'endorphine, *C.R. Acad. Sci.*, 282 (1976) 783-785.
- Gurd, J.W., Jones, L.R., Mahler, H.R. and Moore, W.J., Isolation and partial characterization of rat brain synaptic plasma membranes, *J. Neurochem.*, 22 (1974) 281-290.
- Hajos, F., Tapia, R., Wilkin, G., Johnson, A.L. and Balazs, R., Subcellular fractionation of rat cerebellum : an electron microscopic and biochemical investigation. I. Preservation of large fragments of the cerebellar glomeruli, *Brain Research*, 70 (1974) 261-279.
- Hamprecht, B., Structural, biochemical and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrides in cell culture, *Int. Rev. Cytol.*, 49 (1977) 99-170.
- Harel, S., Watanabe, K.,Linke, I. and Schain, R.J., Growth and development of the rabbit brain, *Biol. Neonat.*, 21 (1972) 381-399.
- Henderson, G., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W., *In vitro* release of leu- and met-enkephalin from the corpus striatum, *Nature*, 271 (1978) 677-679.
- Herndon, R.M. and Coyle, J.T., Selective destruction of neurons by a transmitter agonist, *Science*, 198 (1977) 71-72.
- Hiller, J.M., Simon, E.J., Crain, S.M. and Peterson, E.R., Opiate receptors in cultures of foetal mouse dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord : predominance in DRG neurites, *Brain Research*, 145 (1978) 396-400.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. and Nilsson, G., Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (1977a) 3081-3085.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Terenius, L. and Stein, L., The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system, *Neurosci. Lett.*, 5 (1977b) 25-31.

- Hughes, J., Isolation of an endogenous compound from the brain with the pharmacological properties similar to morphine, *Brain Research*, 88 (1975) 295-308.
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L., Morgan, B.A. and Morris, H.R., Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity, *Nature*, 258 (1975) 577-579.
- Hughes, J., Kosterlitz, H.W. and Smith, T.W., The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues, *Brit. J. Pharmacol.*, 61 (1977) 639-647.
- Hughes, J., Kosterlitz, H.W. and McKnight, A.T., The incorporation of ^{3}H tyrosine into the enkephalin of striatal slices of guinea pig brain, *Brit. J. Pharmacol.*, 63 (1978) 396.
- Iversen, L.L., Iversen, S.D., Bloom, F.E., Vargo, T. and Guillemin, R., Release of enkephalin from globus pallidus *in vitro*, *Nature*, 271 (1978) 679-681.
- Jacobson, M., Development Neurobiology, second edition, Plenum Press, New York and London, 1978.
- Jessel, T.M. and Iversen, L.L., opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus, *Nature*, 268 (1977) 549-551.
- Klee, N.A. and Nirenberg, M., A neuroblastoma X glioma hybrid cell line with morphine receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71 (1974) 3473-3477.
- Kosterlitz, H.W. and Waterfield, A.A., *In vitro* models in study of structure activity relationships of narcotic agents, *Ann. Rev. Pharmacol.*, 15 (1975) 29-47.
- Kuhar, M.J., Pert, C.B. and Snyder, S.H., Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain, *Nature*, 245 (1973) 447-450.
- Kuriyama, K. and Yoneda, Y., Morphine induced alteration of γ-amino-butyric acid an taurine contents and L-glutamate decarboxylase activity in rat spinal cord and thalamus : possible correlates with analgesic action of morphine, *Brain Research*, 148 (1978) 163-179.
- Lamotte, C., Pert, C.B. and Snyder, S.H., Opiate receptor binding in primate spinal cord : distribution and changes after dorsal root section, *Brain Research*, 112 (1976) 407-412.
- Lee, C.Y., Akera, T. and Brody, T.M., Effects of Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+} and Ca^{2+} on the saturable binding of ^{3}H dihydromorphine and ^{3}H naloxone *in vitro*, *J. Pharmac. exp. Ther.*, 202 (1977) 166-173.

- Lewis, R.V., Stein, S., Gerber, L.D., Rubinstein, M. and Udenfriend, S., High molecular weight opioid containing proteins in striatum, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75 (1978) 4021-4023.
- Li, C.H., Lipotropin a new active peptide from pituitary glands, *Nature*, 201, (1964) 924-925.
- Ling, N., Burgus, R. and Guillemin, R., Isolation, primary structure and synthesis of α-endorphin and γ-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity, *Proc. Natl. Sci.*, 73 (1976) 3942-3946.
- Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W., Endogenous opioid peptides : multiple agonists and receptors, *Nature*, 267 (1977) 495-499.
- Lowry, D.H., Roseburgh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- Malfroy, B., Swerts, J.P., Guyon, A., Roques, B.P. and Schwartz, J.C., High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine, *Nature*, 276 (1978) 523-526.
- Mantegazza, P., Tammiso, R., Vicentini, L., Zambotti, F. and Zonta, N., Muscinol antagonism of morphine analgesia in rats, *Br. J. Pharmac.*, 67 (1979) 103-107.
- Marks, N., Grynbaum, A. and Nedle, A., On the degradation of enkephalin and endorphins by rat and mouse brain extracts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74 (1977) 1552-1559.
- McBride, W.J., Nadi, N.S., Altman, J. and Aprison, M.H., Effects of selective dose of X-irradiation on the levels of several amino acids in the cerebellum of the rat, *Neurochem. Res.*, 1 (1976) 141-152.
- McGeer, E.G. and McGeer, P.L., Duplication of biochemical changes of Huntington's Chorea by intra-striatal injection of glutamic and kainic acid, *Nature*, 263 (1976) 517-519.
- Meunier, J.C. and Moisand, C., Binding of Leu^5-enkephalin and Met^5-enkephalin to a particulate fraction from rat cerebrum, *FEBS Lett.*, 77 (1977) 209-213.
- Mikoshiba, K. and Changeux, J.P., Morphological and biochemical studies on isolated molecular and granular layers from bovine cerebellum, *Brain Research*, 142 (1976) 487-504.
- Morin, G., Physiologie du système nerveux central, Masson, Paris, 1974, 133-137.

- Mudge, A.W., Leeman, S.E. and Fischbach, G.D., Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decrease action potential duration, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 (1979) 526-530.
- Olney, J.W., Rhee, V. and Ho, O.L., Kainic acid : a powerful neurotoxic analogue of glutamate, *Brain Research*, 77 (1974) 507-512.
- Palay, S.L. and Chan-Palay, V., Cerebellar cortex : cytology and organisation. Spinger, Berlin, 1974.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H., Opiate receptor : demonstration in nervous tissue, *Science*, 179 (1973) 1011-1014.
- Pert, C.B., Pasternak, G.W. and Snyder, S.H., Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain, *Science*, 182 (1973) 1359-1361.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H., Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium, *Molec. Pharmacol.*, 10 (1974) 868-879.
- Pert, C.B., Snowman, A.M. and Snyder, S.H., Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain, *Brain Research*, 70 (1974) 184-188.
- Pert, C.B. and Snyder, S.H., Identification of opiate receptor binding in intact animal, *Life Sci.*, 16 (1975) 1623-1634.
- Pert, C.B., Kuhar, M.J. and Snyder, S.H., Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain, *Life Sci.*, 16 (1975) 1849-1854.
- Pert, C.B., Kuhar, M.J. and Snyder, S.H., The opiate receptor. Autoradiographic localization in rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 (1976) 3729-3733.
- Pollard, H., Llorens-Cortes, C. and Schwartz, J.C., Enkephalin receptors on dopaminergic neurones in rat striatum, *Nature*, 268 (1977) 745-747.
- Rossier, J., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E. and Guillemin, R., Regional dissociation of β-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (1977) 5162-5165.
- Scheel-Krüger, J. Arnt, J. and Magelund, G., Behavioural stimulation induced by muscimol and other GABA agonist injected into the substantia nigra, *Neurosci. Lett.*, 4 (1977) 351.
- Sellinger, O.Z., Legrand, J., Clos, J. and Ohlsson, W.G., Unequal patterns of development of succinate-dehydrogenase and acetylcholinesterase in Purkinje cell bodies and granule cells isolated in bulk from the cerebellar cortex of the immature rat, *J. Neurochem.*, 23 (1974) 1137-1144.

- Sharma, S.K., Nirenberg, M. and Klee, W.A., Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72 (1975) 590-594.
- Simantov, R. and Snyder, S.H., Morphine-like factors, leucine-enkephalin and methionine-enkephalin : interaction with opiate receptor, *Mol. Pharmacol.*, 12 (1976) 987-998.
- Simantov, R., Snowman, A.M. and Snyder, S.H., A morphine-like factor in rat brain : subcellular localization, *Brain Research*, 107 (1976) 650-657.
- Simantov, R., Childers, S.R. and Snyder, S.H., Opioid peptides : differentiation by radioimmunoassay and radioreceptor assay, *Brain Research*, 135 (1977a) 358-367.
- Simantov, R., Kuhar, M.J., Uhl, G. and Snyder, S.H., Opioid peptide enkephalin : immunohistochemical mapping in the rat cerebral nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (1977b) 467-471.
- Simon, E.J., Hiller, J.M. and Edelman, I., Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^{3}H etorphine to rat brain homogenate, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70 (1973) 1947-1949.
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Groth, J. and Edelman, I., Further properties of stereospecific opiate binding sites in rat brain : on the nature of the sodium effect, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 192 (1975) 531-537.
- Smith, A.P. and Loh, H.H., The sub-cellular localization of stereospecific opiate binding in mouse brain, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.*, 15 (1976) 205-219.
- Squires, R.F. and Braestrup, C., Characteristics and regional distribution of two distinct ^{3}H naloxone binding sites in the rat brain, *J. Neurochem.*, 30 (1978) 231-236.
- Stumpf, W.E. and Roth, L.J., High resolution autoradiographic with dry mounted, freeze-dried frozen sections. Comparative study of six methods using two diffusible compounds : ^{3}H estradiol and ^{3}H mesobilirubinogen, *J. Histochem. Cytochem.*, 14 (1966) 274-187.
- Taube, H.D., Borowski, E., Endo, T. and Starke, K., Enkephalin : a potential modulator of noradrenaline release in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.*, 38 (1976) 377-380.
- Terenius, L., Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, (kbh.), 32 (1973) 317-320.

- Uhl, G.R., Goodman, R.R., Kuhar, M.J. and Snyder, S.H., Enkephalin and neurotensin : immunohistochemical localization and identification of an amygdalofugal pathway. In The Endorphins, Adv. Biochem. Psychopharmacol., Ed. E. Costa, M. Trabuchi, 18 (1978) 71-88, New York : Raven.
- Valcana, T., Hudson, D. and Timiras, P.S., Effect of X-irradiation on the content of amino acids in the developing rat cerebellum, *J. Neurochem.*, 19 (1972) 2229-2232.
- Vinh Tan Tran and Snyder, S.H., Amino acid neurotransmitter candidates in rat cerebellum : selective effects of kainic acid lesions, *Brain Research*, 167 (1979) 345-353.
- Watson, S.J., Akil, H., Sullivan, S. and Barchas, J.D., Immunocytochemical localization of methionine enkephalin : preliminary observations, *Life Sci.*, 21 (1977a) 733-738.
- Watson, S.J., Barchas, J.D. and Li, C.H., β-lipotropin localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (1977b) 5155-5158.
- Wilson, R.S., Rogers, M.E., Pert, C.B. and Snyder, S.H., Homologous N-alkyl-nórketobemidones. Correlation of receptor binding with analgesic potency, *J. Med. Chem.*, 18 (1975) 240-242.
- Yang, H.Y., Hong, J.S. and Costa, E., Regional distribution of leu- and met-enkephalin in rat brain, *Neuropharmacology*, 16 (1977) 303-307.
- Young, A.B., Oster-Granite, M.L., Herndon, R.M. and Snyder, S.H., Glutamic acid : selective depletion by viral induced granule cell loss in hamster cerebellum, *Brain Research*, 73 (1974) 1-13.
- Young Scott, W. and Kuhar, M.J., Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in the brains of humans and animals, *Nature*, 280 (1979) 393-395.
- Zieglgansberger, W. and Bayerl, H., The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of the cat, *Brain Research*, 115 (1976) 111-128.